



KfK 5015
März 1992

**Modifikationen an den
Transkriptionsfaktoren
c-Fos und c-Jun:
Ein Schlüssel zum Verständnis
der schnellen Induktion von
Genen**

S. Gebel
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

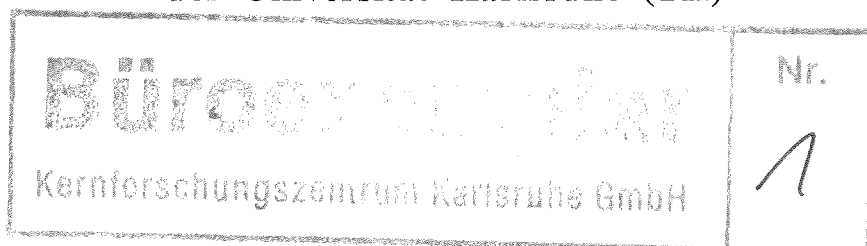
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5015

**Modifikationen an den
Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun:
Ein Schlüssel zum Verständnis der schnellen
Induktion von Genen**

Stephan Gebel

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



Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Säugerzellen sind in der Lage, durch schnelle Änderung des genetischen Programms auf veränderte Umwelteinflüsse zu reagieren. Das menschliche Kollagenase-Gen wird nach TPA-Behandlung oder UV-Bestrahlung von Zellen sehr schnell aktiviert. Beide Induktoren wirken über verschiedene Signalketten, die spätestens in dem Transkriptionsfaktor AP-1 (c-Fos/c-Jun) konvergieren, der für die Induktion der Kollagenase verantwortlich ist. AP-1 wird offensichtlich durch posttranslationelle Modifikationen aktiviert. Sowohl TPA-Behandlung als auch UV-Bestrahlung von Zellen führen bereits nach 15 Minuten zu einer Modifikation von c-Fos und c-Jun. Die Modifikationen sind je nach Induktor unterschiedlich, was bedeutet, daß die durch TPA und UV induzierten Signalketten bis zur Aktivierung von AP-1 unterschiedlich verlaufen. Die Identifizierung der Modifikationen erfolgte durch Peptid Kartierung und Analyse von Deletionsmutanten. Das c-Jun Protein wird nach TPA Induktion im Bereich der Transaktivierungsdomänen phosphoryliert und nahe der DNA Bindedomäne dephosphoryliert. Die UV-induzierten Modifikationen von c-Jun führen zu zwei Modifikationsformen, wobei eine Form die gleichen Modifikationen wie c-Jun nach TPA Induktion trägt, während die andere Form zusätzlich phosphoryliert wird. Das c-Fos Protein wird nach TPA Induktion im carboxyterminalen Bereich sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert und erfährt eine zusätzliche Modifikation, die sich in einem veränderten Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt. UV-Bestrahlung führt nicht zu dieser Modifikation. Desweiteren sind die Phosphorylierungsunterschiede zu c-Fos aus unbehandelten Zellen nicht so prägnant wie nach TPA Behandlung der Zellen. Die Analyse von Deletionsmutanten von c-Fos in der Peptid Kartierung, sowie die Untersuchung der transaktivierenden und TPA-Induktion vermittelnden Domänen durch chimäre GAL4-c-Fos Proteine, führte zur Identifikation von zwei Transaktivierungsdomänen und einer TPA-Induktion vermittelnden Domäne im carboxyterminalen Bereich. Diese können von einer reprimierenden Domäne im äußersten Carboxyterminus unterschieden werden. Die Arbeit hat zum ersten Mal die genetisch relevanten schnellen Modifikationen an c-Fos und c-Jun identifiziert, sie in funktionellen Zusammenhang gestellt und den ersten Hinweis auf Signal-spezifische modifizierende Enzyme geliefert.

Abstract

Modifications of the transcription factors c-Fos and c-Jun: A key to understanding the immediate induction of genes

Mammalian cells react to environmental signals by immediate changes in their genetic program. The human collagenase gene is rapidly induced after the treatment of cells with the tumor promoter TPA or irradiation with ultraviolet radiation. Both inductors work by different signal chains which converge at the latest in the activation of the transcription factor AP-1 (c-Fos/c-Jun), this being the mediator for the induction of the collagenase gene. The activation occurs by posttranslational modifications. C-Fos and c-Jun are already modified 15 min after cell induction. The modifications are different for TPA treatment and UV irradiation. This shows, that the different pathways do not converge before the activation of AP-1. The modifications were characterized by peptid mapping and analysis of deletion mutants. The c-Jun protein becomes increasingly phosphorylated in the transactivation domain and dephosphorylated near the DNA binding domain after treatment of cells with TPA. UV irradiation leads to two different modified forms of the c-Jun protein. One of them shows the same modifications as c-Jun from TPA treated cells, whereas the other form shows two additional phosphorylations. The c-Fos protein becomes phosphorylated as well as dephosphorylated after TPA treatment of cells. Besides this, there is an additional modification which leads to a change in the electrophoretic mobility of the Fos protein. This modification is not detectable after UV irradiation of cells. Moreover, the changes in phosphorylation are not as pronounced as after the TPA treatment of the cells. The investigation of the transactivation ability of the c-Fos wildtype protein and the deletion mutants by GAL4-Fos fusion proteins leads to the identification of two transactivation domains and one domain, which mediates the activation of the c-Fos by TPA. All of these domains are located in the carboxyterminal region of the protein and can be distinguished from a repressing domain in the extreme carboxyterminal end of the protein. In the present work, the genetically relevant rapid modification of c-Fos and c-Jun have been identified and put in a functional connection. Moreover, first hints were provided for signal specific modifying enzymes.

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BES	N, N-bis (2 Hydroxyethyl)-2-aminosulfodixidsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
c-Fos	zelluläres Fos-Protein
c-fos	zelluläres Fos-Gen
c-Jun	zelluläres Jun-Protein
c-jun	zelluläres Jun-Gen
cpm	counts per minute
CRE	cAMP-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CTP	Cytidintriphosphat
CMV	Cytomegalo-Virus
DC	Dünnschicht-Chromatographie
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
NaDOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiotreitol
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EPIF	Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GHF1	Wachstumshormon spezifischer Transkriptionsfaktor growth hormone specific transcription factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H7	1-(5-Isoquinolinsulfonyl)-2-methylpiperazin dihydrochlorid
H8	N-[2-(methylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IL-1 α	Interleukin 1 α
kb	1000 Basenpaare
kD	1000 Dalton
LTR	Long terminal repeat
Ma	Molekulargewichtsmarker
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute
NF-kB	Nuklearer Faktor-kappa B
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat

PIS	Preimmun-Serum
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous Sarkoma Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-AA-Gel	denaturierendes SDS Polyacrylamid Gel
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	TPA-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
	TPA responsive element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Enzymeinheiten pro ml
URE	UV-Induktion von Genen vermittelndes DNA-Element
UV	Ultraviolette Strahlung
v-Fos	virales Fos-Protein
v-fos	virales Fos-Gen
v-Jun	virales Jun-Protein
v-jun	virales Jun-Gen

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

ABKÜRZUNGENI

INHALTSVERZEICHNISIII

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND METHODEN11

MATERIAL11

 Bezugsquellen.....11

 Bestrahlungsquelle12

 Radiochemikalien.....13

 Antikörper13

 Bakterien und Zellen14

 Kulturmedien.....14

 Plasmid Konstruktionen15

METHODEN17

1. Behandlung von Nukleinsäuren17

 Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmungen von
 Nukleinsäuren.....17

 Phenol/Chloroform Extraktion.....17

 Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....17

2. DNA Präparation18

 Plasmid DNA Präparation18

 Mini Plasmid DNA Präparation.....19

3. Klonierungstechniken19

 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen19

 Dephosphorylierung von DNA20

Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern	20
Auffüllen von 5' Überhängen.....	20
Ligation von DNA-Fragmenten.....	20
4. DNA-Gelelektrophorese.....	21
Agarose-Gelelektrophorese.....	21
Acrylamid-Gelelektrophorese	21
Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele	22
5. Sequenzierung von DNA.....	23
6. Transformation von Bakterien	23
Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	23
Transformation von kompetenten Zellen.....	24
Herstellung von Selektiv-Agarplatten	24
7. Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen.....	24
8. Transiente Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren	25
DEAE-Dextran-Methode.....	25
CaPO ₄ -Methode	25
CaPO ₄ -Methode	26
Induktion von Zellen	26
9. CAT-Assay.....	26
10. Extrakt Präparation aus eukaryontischen Zellen.....	28
Herstellung eines Zellysates aus radioaktiv markierten Zellen	28
11. Proteingele	28
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	28
Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen.....	29
12. Metabolische Markierung von Proteinen	29
Markierung mit ³⁵ S Methionin.....	29
Markierung mit ³² P Orthophosphat	30
Markierung von transient exprimierten, exogenen Proteinen.....	30
13. Immunpräzipitation	31
Dephosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen.....	32
14. Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose	32
15. Peptid Analyse	33
Aufarbeitung des Proteins	33
Auftrennung der Peptide.....	34

ERGEBNISSE	37
1. Erfassung der Modifikationen	37
1.1. C-Fos und c-Jun werden nach Behandlung von Zellen mit TPA posttranslational modifiziert	38
1.2. Die Modifikationen erfolgen innerhalb von nur 5 Minuten und sind mindestens 45 Minuten stabil.....	40
1.3. Unvollständige Modifikation von c-Fos in F9 Zellen	43
1.4. C-Fos und c-Jun liegen sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach Induktion als Phosphoproteine vor.....	44
1.5. Dephosphorylierung von c-Fos und c-Jun führt nicht zum vollständigem Verlust der Modifikationen am aktivierten c-Fos.	46
1.6. Auch UV Strahlung führt zu einer schnellen Modifikation von c-Fos und c-Jun.....	48
2. Analyse der Modifikationen.....	50
2.1. Tryptische Peptide von endogenem c-Jun Protein	50
2.1.1. Analyse der Peptid Muster von c-Jun aus un- behandelten und TPA-behandelten Zellen	51
2.1.2. Analyse der Peptid Muster von c-Jun aus UV-bestrahlten Zellen.....	53
2.2. Kartierung der Phosphorylierungsstellen im c-Jun mittels c-Jun Deletionsmutanten.	56
2.2.1. Kartierung der Peptide x und u	60
2.2.2. Kartierung der Peptide a,b,c	60
2.2.3. Kartierung von Peptid v	61
2.3. Tryptische Peptide von endogenem c-Fos Protein	62
2.4. Peptid Kartierung von exogenem, transient exprimierten c-Fos Protein	64
2.4.1. Peptid Kartierung des transient exprimierten c-Fos Wildtyp Protein mit verschiedenen Proteasen.	65
2.4.2. Peptid Kartierung des transient exprimierten c-Fos Wildtyp Protein nach UV Bestrahlung der Zellen	66

2.5. Kartierung der Phosphorylierungsstellen im c-Fos Protein mittels Deletionsmutanten.....	69
3. Bedeutung der Modifikationen	74
3.1. Analyse der c-Fos Deletionsmutanten im transienten Assay.....	74
DISKUSSION.....	79
Modifikation von c-Jun durch TPA	79
Modifikation von c-Jun durch UV.....	81
Modifikation von c-Fos nach TPA	82
Modifikation von c-Fos durch UV	86
Transaktivierung und Transformation.....	86
Modell der schnellen Genaktivierung durch TPA- und UV-induzierte Modifikationen von AP-1.....	87
LITERATURVERZEICHNIS.....	89

Einleitung

Die schnelle Änderung des genetischen Programms ist eine der wichtigsten Reaktionen der eukaryontischen Zelle auf sich ändernde Umwelteinflüsse. Voraussetzung für diese Fähigkeit ist: (1) die Erfassung der Veränderungen, (2) die Umwandlung und Transduktion des Signals und (3) die Modifikation von regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die damit in die Lage versetzt werden, bestimmte Gene zu aktivieren oder zu reprimieren, und so zur Änderung des genetischen Programms führen.

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Erfassung von extrazellulären Signalen, wie beispielsweise Hormonen oder Wachstumsfaktoren, durch spezifische Rezeptoren in der Zellmembran oder im Inneren der Zelle. Die Membranrezeptoren besitzen meistens Proteinkinaseaktivität, die die Weitergabe der Information ermöglichen (Heldin und Westmark, 1984; Evans, 1988). Bei den Signalketten, welche die extrazellulären Signale in die verschiedenen Kompartimente der Zelle weiterleiten, sind Protein-Kinasen und Phosphatasen von zentraler Bedeutung. Spezifische Protein-Kinasen übertragen Phosphat von ATP auf Serin/Threonin oder Tyrosin (zur Übersicht: Hunter und Cooper, 1985; Edelman et al., 1987). Protein-Phosphatasen entfernen Phosphat aus Tyrosin oder Serin/Threonin. Je nach Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren werden die Serin/Threonin-Phosphatasen derzeit grob in zwei Gruppen, Phosphatase I und Phosphatase II, und diese nochmals in IIA, IIB und IIC untergliedert (zur Übersicht: Cohen, 1989). Fehlfunktionen innerhalb der Phosphatasen und Kinasen können zur Transformation von Zellen führen. So kodiert beispielsweise das raf Onkogen für ein cytoplasmatisches Protein mit Serin/Threonin-Kinase Aktivität (Moelling et al., 1984; Rapp, 1991) und das pp60 v-src Onkogen für eine membran-assoziierte Tyrosin-Kinase (Hunter und Sefton, 1980; Hunter und Cooper, 1985).

Wichtige Endpunkte der Signalkette sind die Transkriptionsfaktoren. Die Modifikation dieser Proteine und die damit verbundene Aktivierung oder Repression von Genen ermöglicht die schnelle Reaktion von Zellen auf veränderte Umweltbedingungen oder Signale (Serfling et al., 1985; Ptashne, 1988). Änderungen im Phosphorylierungszustand von positiven oder negativen Transkriptionsfaktoren oder von Inhibitoren, nach Induktion mit unterschiedlichen Agenzien, führen in vielen Fällen zu einer veränderten Gen-Regulation. Der Glucocorticoidrezeptor beispielsweise ist unter nicht induzierten

Bedingungen, im Zytoplasma an einen Inhibitor gebunden. Die Bindung von Glucocorticoiden an den Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung desselben, der Loslösung vom Inhibitor und der Translokation in den Kern. Dort aktiviert er als Transkriptionsfaktor Glucocorticoid-abhängige Gene (Evans, 1988; Beato, 1989; Hoeck et al., 1989 und eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Ein ähnlicher Mechanismus ist für den nukleären Faktor kappa B (NFkB) postuliert. NFkB liegt ebenfalls im Cytoplasma, an einen Inhibitor gebunden, vor. Die Aktivierung der Zelle mit UV-Strahlung führt zur Phosphorylierung des Inhibitors und damit verbunden zur Freisetzung von NFkB, welcher in den Kern transloziert wird und dort an der Induktion verschiedener Gene beteiligt ist (Stein et al., 1989; Shirakawa et al., 1989; Ghosh und Baltimore, 1990). Andere Transkriptionsfaktoren werden direkt im Kern phosphoryliert. Die DNA-Bindung von bakteriell exprimiertem SRF ('serum response faktor') wird durch Phosphorylierung durch die Casein Kinase II verstärkt (Manack et al., 1990). Phosphorylierung induziert auch die Bindungsfähigkeit und die transkriptionelle Aktivität des Kernproteins CREB (Yamamoto et al., 1988), ebenso ist die Phosphorylierung des Adenovirus-kodierten viralen Proteins E4F zur DNA-Bindung wichtig (Raychaudhuri et al., 1989). Andererseits kann Phosphorylierung auch zur Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Ein Beispiel hierfür ist die Inaktivierung des Transkriptionsfaktor ADR I aus Hefen durch Phosphorylierung (Cherry et al., 1989). Die Beispiele zeigen, daß Phosphorylierungen für die Aktivierung und Repression von Transkriptionsfaktoren äußerst wichtig sein können.

Die Behandlung von Säugerzellen mit dem Phorbol-ester TPA (12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) führt zu einer schnellen Induktion von verschiedenen Genen, darunter auch das Kollagenase Typ I Gen (im Folgenden nur noch mit Kollagenase bezeichnet). Die Kollagenase Type I ist eine Matrix-Metalloprotease, die für den extrazellulären Abbau der Kollagenfaser vom Type I verantwortlich ist. Sie spielt eine wichtige Rolle in schnell wachsendem Gewebe, bei der Wundheilung und bei der Bildung von Metastasen (Liotta et al., 1980, 1986; Stricklin und Welgus, 1983; Woolley, 1984; Harris et al., 1984; Murphy und Reynolds, 1985; Angel et al., 1987a; Murphy et al., 1987; Brenner et al., 1989). Die menschliche Kollagenase-Gen wird in vielen verschiedenen Zelltypen, und durch eine Vielzahl von äußeren und inneren Einflüssen wie Wachstumsfaktoren, Onkogen-Produkten, Phorbol-ester und UV-Strahlung aktiviert (Mallick et al., 1982; Schorpp et al., 1984; Angel et al., 1985, 1986, 1987b; Herrlich et al., 1986; Schönthal et al., 1988a, b; Stein et al., 1988, 1989; Scharffetter et al., 1989).

Der Tumorpromotor TPA führt in Säugetierzellen zu einer Vielzahl von Veränderungen in Metabolismus, Morphologie und Wachstum (Diamond, 1987; Rahmsdorf und Herrlich,

1990). Zum Verständnis der Wirkung von Tumorpromotoren kann das 2-Stufenmodell, welches von der Entstehung von Hautkrebs in Mäusen abgeleitet worden ist, herangezogen werden (Slaga et al., 1980; Diamond, 1987). Das Modell unterscheidet zwischen Tumorinitiation und Tumorpromotion. Die Tumorinitiation erfolgt durch niedere Dosen von Karzinogenen wie beispielsweise γ - und UV-Bestrahlung oder chemischen Substanzen wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Diese niederen Dosen führen erst nach langer Zeit zur Entstehung von Tumoren. Tumorpromotoren verkürzen die Zeit zwischen Applikation und Entstehung des Tumors. Sie sind jedoch alleine nicht in der Lage, Tumore zu induzieren (Slaga et al., 1980; Diamond, 1987). Der stärkste natürlich vorkommende Tumorpromotor ist der Phorbolster TPA, welcher aus dem Samen des südasiatischen Baumes "Croton tiglium" gewonnen wird (Hecker, 1968).

TPA dringt aufgrund seiner Fettlöslichkeit in die Zellmembran ein und bindet dort an seinen Rezeptor, die Protein Kinase C (PKC). Dies konnte unter anderem dadurch gezeigt werden, daß nach TPA-Behandlung von Säugetier-Zellen eine Translokation der PKC vom Zytoplasma in die Zellmembran stattfindet (Tapley und Murray, 1984; Darbon et al., 1987; Büscher et al., 1988) und daß die PKC gemeinsam mit dem vermeintlichen Phorbolster-Rezeptor aufgereinigt wird (Kikkawa et al., 1983; Parker et al., 1984). Die durch TPA aktivierte PKC setzt wahrscheinlich eine Signalkette in Gang, an deren Ende die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern steht (Nishizuka, 1984, 1986; Rahmsdorf und Herrlich, 1990; Gschwendt et al., 1991). Dabei imitiert TPA die natürliche Induktion der Zelle durch Wachstumsfaktoren oder Hormone. Diese Induktoren wie beispielsweise der aus Blutplättchen gewonnene Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor) binden an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran (Heldin und Westermark, 1984; Rozengurt, 1986). Die aktivierten Rezeptoren bewirken über Zwischenstufen die Aufspaltung von Phosphatidylinositol in Inositol-Triphosphat und Diacylglycerol. Inositol-Triphosphat führt zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Ca^{2+} und Diacylglycerol schließlich sind die natürlichen Aktivatoren der PKC. Die aktivierende Wirkung von TPA auf die PKC beruht auf der Strukturähnlichkeit von TPA und Diacylglycerol (Berridge und Irvine, 1984; Nishizuka, 1984, 1986). Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß PKC der einzige Mediator der TPA-Induktion ist. Verschiedene Hemmstoffe der PKC sind nicht in der Lage, die Induktion des c-fos Gens durch TPA zu hemmen (Loferer, 1989). 2-Aminopurin hemmt die c-fos mRNA-Akkumulation nach TPA, verhindert aber nicht die durch PKC induzierte Phosphorylierung eines 80 kD Proteins (Mahadevan et al., 1990). Andererseits ist die PKC kein Einzelprotein, sondern steht stellvertretend für eine ganze Protein-Familie (Ohno et al., 1987, 1988; Kikkawa et al., 1987; Ono und Kikkawa, 1987; Ono et al., 1987; Nishizuka 1988).

Der genaue Verlauf der durch TPA Behandlung von Zellen induzierten Signalkette bis in den Zellkern ist noch nicht endgültig geklärt. Die Endpunkte der Induktion sind jedoch weitgehend bekannt. TPA führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Genen (zum Überblick: Rahmsdorf und Herrlich 1990). Im Promotorbereich eines dieser Gene, der Kollagenase, konnte eine 8 bp lange Sequenz identifiziert werden, das TRE ('TPA responsive element'), welches notwendig und hinreichend für die TPA Induktion des Kollagenase-Gens ist (Angel et al., 1987a, b; Jonat et al., 1990). Zwischenzeitlich wurden TREs in einer Reihe anderer Gene gefunden. Die Sequenzen aus dem SV-40 Enhancer, Metallothionein IIA und Stromelysin vermitteln beispielsweise, in gleicher Weise wie das Kollagenase TRE, die TPA-Induzierbarkeit der Gene (Chiu et al., 1987; Lee et al., 1987a; Matrisan et al., 1986; Kerr et al., 1988). TRE Sequenzen führen jedoch nicht zwangsläufig zur TPA Induzierbarkeit der nachfolgenden Gene. Außerdem konnten völlig andere Sequenzen identifiziert werden, die auch für die TPA Induktion verantwortlich sind (Rahmsdorf und Herrlich, 1990).

Durch DNA-Affinitätschromatographie konnte ein Faktor gereinigt werden, der an das TRE bindet und für die Induktion des Kollagenase-Gens nach TPA verantwortlich ist. Dieser Transkriptionsfaktor wurde AP-1 (Aktivator Protein 1) genannt (Angel et al., 1987b; Lee et al. 1987b). AP-1 ist ein Heterodimer der Protoonkogen-Produkte c-Fos und c-Jun (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988a; Rauscher et al., 1988a, b; Franza et al., 1988; Chiu et al., 1988; Sassone-Corsi, 1988a; Curran und Franza 1988; Gebel et al., 1989). Die entsprechenden Onkogene v-fos und v-jun wurden zwei Maus-Sarkomviren (FBR-MSV; FBJ-MSV: Finkel et al., 1966; van Beveren et al., 1983, 1984; Curran et al., 1984) bzw. aus einem Hühner-Sarkomvirus (ASV 17: Maki et al., 1987) isoliert. Die Interaktion von c-Fos und c-Jun verläuft über eine α helikale Struktur, den sogenannten 'Leucine Zipper' (Landschulz et al., 1988; Kouzarides und Ziff 1988; Sassone-Corsi et al., 1988b; Schuermann et al., 1989; Ransone et al., 1989; Turner und Tjian, 1989; Busch und Sassone-Corsi, 1990). Beide Proteine verfügen über eigene DNA-Bindedomänen und eigene Transaktivierungsdomänen (Rauscher et al., 1988b; Neuberg et al., 1989; Gentz et al., 1989; Angel et al., 1989; Hirai et al., 1990; Abate et al., 1991; Lucibello et al., 1991). C-Fos ist jedoch nicht in der Lage, Homodimere zu bilden und/oder allein an das TRE zu binden. C-Jun dagegen bildet in vitro Homodimere aus, bindet an das TRE und kann die Transkription induzieren (Halazonetis et al., 1988; Nakabeppu und Nathans, 1989; Neuberg et al., 1989; Bohmann et al., 1989; Abate et al., 1991). Die Bindungsaffinität der c-Jun Homodimere zum TRE ist jedoch bedeutend geringer als die von c-Jun/c-Fos Heterodimeren (Nakabeppu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Rauscher et al., 1988b). Inwieweit die Homodimere auch in vitro eine Bedeutung haben, ist bislang nicht geklärt. Sie sind

jedoch in der Lage, in F9 Zellen, die mit Retinolsäure induziert wurden, verschiedene Genen zu transaktivieren (Yang-Yen et al., 1990a). AP-1 gehört einer Familie von Proteinen an, die ähnliche DNA-Bindesequenzen haben. Innerhalb der Familie kann es zu unterschiedlicher Homo- und Heterodimer-Bildung kommen, welche wahrscheinlich auch die DNA-Bindesepezifität beeinflussen und eine Bedeutung für die Transaktivierung von Genen haben (Franza et al., 1988; Hai et al., 1988; Nakkabeppu et al., 1988; Hirai et al., 1989; Ryder et al., 1989; Zerial et al., 1989; Chiu et al., 1989; Cohen et al., 1989; Kovary und Bravo, 1991). Daneben können c-Jun und c-Fos einzeln oder im AP-1 Komplex auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. (Distel et al., 1987; Jonat et al., 1990; Diamond et al., 1990; Offringa et al., 1990; Wasylyk et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990b; Stein, 1990; Touray et al., 1991).

Das c-fos und das c-jun Gen gehören zur Klasse der sogenannten 'immediate early genes', die sich durch eine schnelle aber transiente Expression nach Induktion der Proliferation in Fibroblasten auszeichnen (Greenberg und Ziff, 1984; Almendral et al., 1988; Lau und Nathans 1987; Kovary und Bravo, 1991). Auch TPA, Serum, UV-Strahlung und Wachstumsfaktoren lösen diese schnelle aber transiente Induktion von c-fos und c-jun aus. Die Erhöhung der c-jun und c-fos mRNA Menge erfolgt innerhalb von 5-10 Minuten nach Induktion und ist daher unabhängig von Proteinneusynthese (Greenberg und Ziff 1984; Angel et al., 1985; Greenberg et al., 1986; Lamph et al., 1988; Angel et al., 1988b; Büscher et al., 1988; König et al., 1989; Stein et al., 1990).

Das c-fos Gen wird hauptsächlich über die Modifikation des SRF ('serum response factor'), der an das SRE ('serum responsive element') im c-fos Promotor bindet, reguliert (Treisman, 1986, 1987; Norman et al., 1988; Büscher et al., 1988; Manak et al. 1990). Die Beteiligung von zusätzlichen Faktoren ist zur Zeit umstritten (Ryan et al., 1989; Shaw et al., 1989; Herrera et al., 1989; Graham und Gilman, 1991; König, 1991). Daneben existieren im c-fos Promotor auch noch andere regulatorische Sequenzen, die beispielsweise die Induktion des Gens durch cAMP vermitteln (Bücher et al., 1988; Härtig et al., 1991). Die Abschaltung des Fos Gens erfolgt ebenfalls über das SRE, ist jedoch von der Neusynthese des c-Fos Proteins abhängig. Wahrscheinlich reprimiert c-Fos den c-fos Promotor und verhindert eine Überexpression des Proteins (Wilson und Treisman, 1988; Sassone-Corsi et al., 1988c). In Versuchen mit antisense c-fos RNA, welche die Translation der c-fos RNA durch spezifische Hybridisierung verhindert, ist der Basalwert an c-fos RNA erhöht und die Repression des c-fos Gens nach Induktion blockiert (Schönthal et al., 1989). Daneben führt die Behandlung von Zellen mit dem Translationshemmstoff Anisomycin zu einer Superinduktion des c-fos Gens (Rahmsdorf et al., 1987). Unabhängig davon wurde eine Repression des c-Fos Gen durch das

Retinoblastoma Gen Produkt (RB-1) festgestellt, die nicht über das SRE verläuft (Robbins et al., 1991).

Die Induktion des c-jun Promotor, der kein SRE besitzt, wird durch zwei DNA-Elemente (Jun UREs) vermittelt. (Stein et al., 1990; 1991) An diese DNA-Elemente binden wahrscheinlich Proteine aus der Jun Familie (Angel et al., 1988b; Stein et al., 1990; 1991). Die schnelle Abschaltung des Gens erfolgt möglicherweise auch durch einen Autorepressions-Mechanismus, wobei neben c-Jun auch c-Fos den Jun Promotor reprimieren kann (K-K. Park, unveröffentlichte Daten). Die Behandlung von Zellen mit dem Translationshemmstoff Anisomycin führt jedenfalls auch zu einer Superinduktion des c-jun Gens (Stein et al., 1991).

Die mittelfristige und länger anhaltende TPA Induktion von Genen, wie beispielsweise der Kollagenase, erfolgt größtenteils über die Induktion der Protoonkogenprodukte c-Fos und c-Jun, die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 und die Transaktivierung der Gene über das TRE. Für die vollständige Aktivierung des Kollagenase-Gens sind jedoch noch andere Transkriptionsfaktoren notwendig, die im 5' Bereich vor dem TRE binden und außerdem für die Transkriptionshemmung der Kollagenase durch Proteinsynthesenblocker, wie Cycloheximid und Anisomycin, verantwortlich sind (Angel 1987a; Wasyluk et al., 1989; Auer, 1990).

Eine nicht minder wichtige Bedeutung hat AP-1 bei der schnellen Induktion des Kollagenase-Gens in Folge der Behandlung von Säugerzellen mit TPA. Diese Induktion wird ebenfalls durch das TRE und den daran bindenden Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt. Schon 30 Minuten nach der TPA-Behandlung der Zellen, ist eine erhöhte Bindeaktivität an die TRE Sequenz und eine Erhöhung der Kollagenase mRNA in den Zellen nachzuweisen (Angel et al., 1987a, b; Chiu et al., 1987; Stein et al., 1989; Stein, 1990). Außerdem sind Transkriptionshemmer nicht in der Lage, die mRNA Induktion der Kollagenase nach TPA-Behandlung von Zellen vollständig zu hemmen (Jonat et al., 1991, Krämer et al., 1990). Enhancerkonstrukte mit multimeren TRE Sequenzen werden durch Anisomycin kaum gehemmt (Jonat et al., 1991) und Bindungsstudien zeigen, daß auch unter Anisomycin Bedingungen eine erhöhte Bindefähigkeit von Proteinen an TRE-Sequenzen nach TPA-Induktion vorhanden ist (Stein, 1990). In allen Fällen müssen Modifikationen am c-Fos und/oder c-Jun stattgefunden haben, welche die Proteine in eine aktivierende Form überführen. Außerdem sind Repressionsmechanismen des Kollagenase-Gens bekannt, die ebenfalls von Proteinneusynthese unabhängig ablaufen. Möglicherweise ist auch hierfür eine Modifikation von AP-1 verantwortlich (Jonat et al., 1990; Offringa et al., 1990). Modifikationen von AP-1, wie Phosphorylierung und

Glykosylierung sind vielfach beschrieben worden (Curran et al., 1984; Barber und Verma, 1987; Currann et al., 1987; Müller et al., 1987; Lee et al., 1988; Franza et al., 1988; Jackson und Tjian 1988), konnten jedoch bisher nicht in einen kausalen Zusammenhang mit der Induktion von Genen gebracht werden.

Der andere wichtige Induktor der 'immediate early' Gene, UV-Strahlung, ist im Gegensatz zum Tumorpromotor TPA ein Karzinogen. Hohe Dosen an UV-Strahlung können die Tumorentstehung induzieren. Legt man das 2-Stufenmodell zugrunde, so übernimmt UV sowohl Tumorentstehung als auch Tumorpromotion (Scribner und Scribner, 1980). Säugetier-Zellen in Kultur reagieren auf UV-Bestrahlung mit einer Reihe von genetischen Veränderungen wie Erhöhung der Mutationsrate (Protic-Sablic et al., 1986), Erhöhung der Zahl von chromosomalen Aberrationen, Amplifikation von Genen (Schimke, 1984; Lücke-Huhle et al., 1989) und Geninduktion (zur Übersicht: Herrlich et al., 1991). Die Gesamtheit der Veränderungen in der Zelle nach UV-Bestrahlung oder Behandlung mit anderen DNA schädigenden Agenzien wird UV Antwort genannt (Schorpp et al., 1984; Herrlich et al., 1986; Kaina et al., 1989; Mai et al., 1989; Herrlich et al., 1991).

UV Strahlung hat gegenüber TPA einen völlig anderen Induktionsweg. Es konnte gezeigt werden, daß das primäre Ereignis für die Auslösung der Genaktivierung nach UV-Bestrahlung die Schädigung der DNA durch Ausbildung von Pyrimidin-Dimeren ist. (1) Das Aktionsspektrum der UV-Induktion unterschiedlicher Gene zeigt ein Optimum bei 265 - 275 nm. Dies ist der Wellenlängenbereich, in dem Säugerzellen am effektivsten durch UV-Strahlung abgetötet werden (Zölner und Kiefer, 1984) und in dem Nukleinsäuren wie DNA und RNA am stärksten die UV-Strahlung absorbieren (Stein et al., 1989). (2) Xeroderma pigmentosum Zellen der Komplementationsgruppe A können die UV-induzierten Schäden in der DNA nicht mehr reparieren. In diesen Zellen werden viel geringere Mengen an UV-Strahlung zur maximalen Aktivierung der Gene gebraucht als in Wildtypzellen (Stein et al., 1989). (3) Das Einbringen von UV-bestrahlter DNA in unbestrahlte Säugetier-Zellen führt in diesen Zellen zur gleichen Aktivierung von Genen wie direkte Bestrahlung (Mai et al., 1989; Krämer et al., 1990). Dies zeigt, daß die DNA-Schäden notwendiges Zwischenprodukt für die Aktivierung der Gene sind.

Der weitere Verlauf der Signalkette von der geschädigten DNA zur Genaktivierung ist nicht auf den Zellkern beschränkt, sondern verläuft durch das Zytoplasma. Komponenten der Signaltransduktion schließen extrazelluläre Faktoren mit ein. So führt UV-

Bestrahlung zur Aktivierung des im Zytoplasma an einen Inhibitor gebundenen NFkB und damit verbunden zur Translokation von NFkB in den Kern (Stein et al., 1989; Bäuerle und Baltimore 1988a, b, 1989). Der Signalweg über das Zytoplasma könnte mit der Sekretion eines Faktor zu tun haben, den man im Medium von UV-bestrahlten Säugetier-Zellen findet und der in unbestrahlten Zellen ein ähnliches genetisches Programm induziert wie direkte Bestrahlung, beispielsweise die Expression der Kollagenase. Dieser Faktor wurde EPIF (extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor) genannt (Schorpp et al., 1984). EPIF besteht wahrscheinlich aus einer Kombination von basischem Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) und Interleukin 1 α (IL 1 α) (Krämer, 1991). Vermutlich sind Proteinkinasen an der Signaltransduktion beteiligt. Die Proteinkinase-Inhibitoren H7, H8 hemmen die Induktion des c-fos Gens durch UV (Krämer et al., 1990). Die UV-Induktion in Säugetier-Zellen läuft wahrscheinlich teilweise über zelleigene Signalketten, die durch die Schädigung der DNA, auf bisher nicht bekannte Weise, induziert werden (Herrlich et al., 1991).

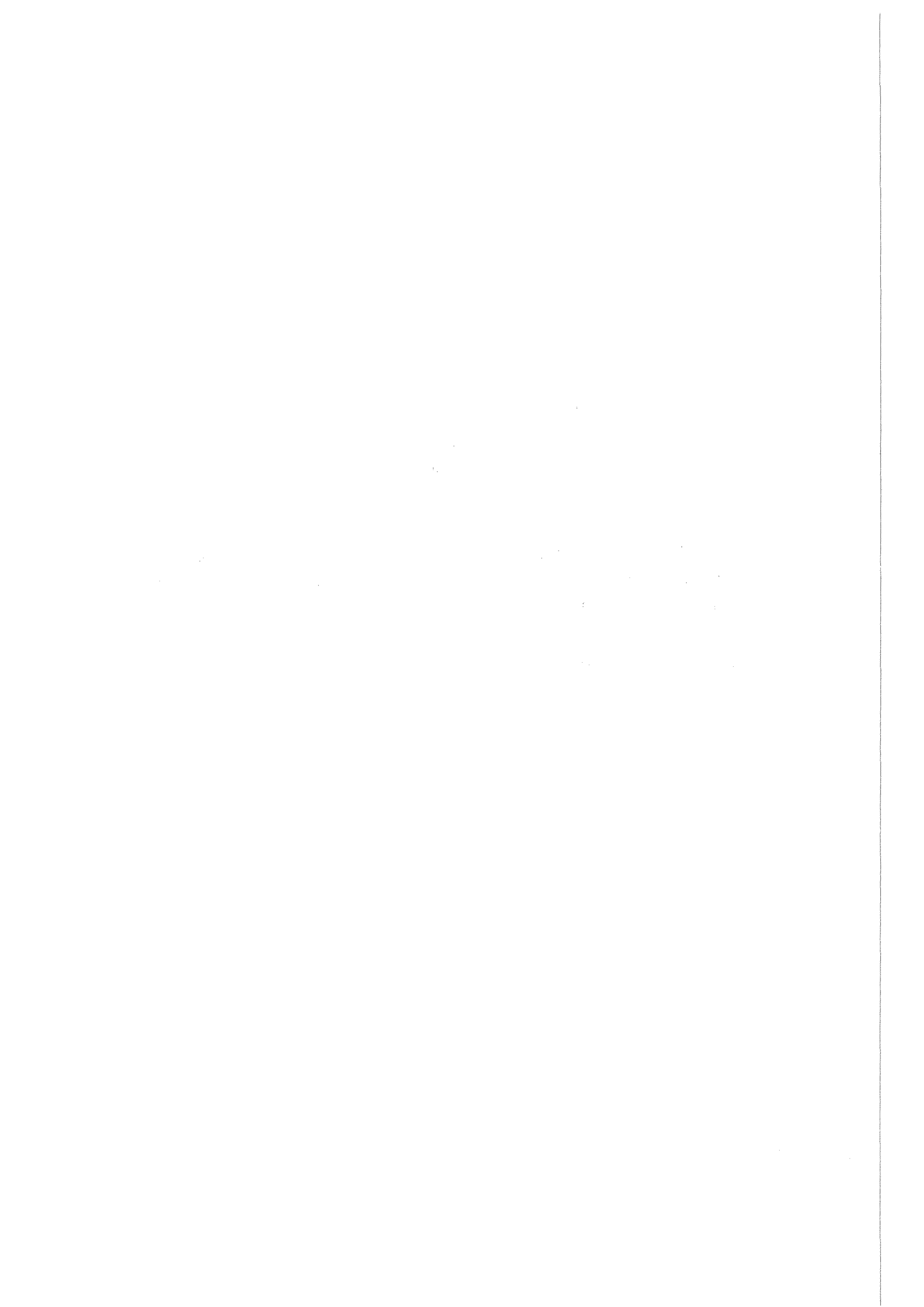
UV-Bestrahlung von Zellen führt ebenso wie die Behandlung mit TPA zu einer schnellen, von Proteinneusynthese unabhängigen Induktion des Kollagenase-Gens, sowie zur Induktion von c-fos und c-jun (Stein et al., 1989; Krämer et al., 1990; Stein 1990). Obwohl die Induktion des c-fos Gens durch TPA-Behandlung oder UV-Bestrahlung von Zellen durch die Proteinkinasehemmer H7, H8 blockiert wird, ist es jedoch unwahrscheinlich, daß beide Induktoren die gleiche Signalkette benutzen (Büscher et al., 1988). Behandlung von Zellen mit TPA oder Bestrahlung mit UV führen in der Zelle zur Refraktorität gegenüber dem gleichen Induktor. Dies bedeutet, daß eine Komponente der Signalkette verbraucht wurde und eine gewisse Zeit für die Reetablierung der Komponente notwendig ist. Im Gegensatz dazu sind Zellen nach TPA Induktion sofort wieder in der Lage, auf UV zu reagieren und umgekehrt (Büscher et al., 1988). Dies spricht, neben der völlig verschiedenen Induktionswege, dafür, daß TPA und UV verschiedene Signalketten benutzen um die Transkription von Genen zu induzieren.

Zielsetzung:

Behandlung von Säugerzellen mit dem Phorbol ester TPA führt innerhalb von 30 Minuten zur Erhöhung der Kollagenase mRNA. Diese Induktion erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Ziel der vorliegenden Arbeit war:

- (1) die Erfassung der schnellen posttranslationalen Modifikationen an den AP-1 Untereinheiten c-Fos und c-Jun.
- (2) die Lokalisation der Modifikationen in den Proteinen
- (3) die Analyse der Modifikationen im Hinblick auf ihre Fähigkeit die transaktivierenden Eigenschaften von c-Fos und c-Jun zu verändern

UV-Bestrahlung von Zellen führt ebenfalls zu einer schnellen Induktion des Kollagenase-Gens. Auch diese Induktion wird durch den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt. Ein Vergleich der, durch TPA-Behandlung und UV-Bestrahlung von Zellen induzierten Modifikationen soll klären, ob und an welcher Stelle es zu einer Konvergenz der beiden verschiedenen Signalwege kommt.



MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

Bezugsquellen:

Acetyl-Coenzym A, Li-Salz	Pharmacia, Freiburg u. Sigma, München.
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose Typ II, Typ VII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase (20 U/ μ l) (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
BSA	Serva, Heidelberg
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
Chymotrypsin	Sigma, München
DC-Platten (Cellulose beschichtet)	Merck, Darmstadt
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
DMEM (ohne Phosphat)	Serva, Heidelberg
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ml)	Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt
Elektrophorese-Apparatur für DC-Platten	Camay, Berlin
Emulsifier Safe	Packard Instrument Company, Illin.
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (nordamerikan. Ursprung)	Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München
HEPES	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad Laboratories, München
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Para-nitrophenylphosphat	Merck, Darmstadt

Penicillin/Streptomycin
Pepstatin A
PMSF
Protein A-Sepharose
Protein-Molekulargewichtsmarker
(14.4; 21.5; 31; 42.7; 66.2; 97.4 kD)
Pyridin
Restriktions-Endonukleasen

RNase A (5 mg/ml)
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)
RPMI 1640
RPMI (ohne Methionin)
Silan
T4-DNA-Ligase (2 U/μl)
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/μl)
T7-Sequenz-Kit
TEMED
TPA
transfer-RNA (aus Kalbsleber)
Transformations-Chemikalien
Trypsin (sequencing grade)
UV-Lampe 254 nm
Whatman 3MM-Papier
Whatman GF/C-Filter
Zellkulturflaschen
Zellkulturschalen

Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Sigma, München
Serva, Heidelberg
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
Amersham, Braunschweig
Gibco, Eggenstein b. Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Wacker Chemie, München
Promega Biotec, Heidelberg
Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt
USB, Cleveland, USA
Bio Rad Laboratories, München
Sigma, München
Boehringer, Mannheim
Fluka, Buchs Schweiz
Boehringer, Mannheim
Vetter, Wiesloch
Bender & Hobein, Karlsruhe
Bender & Hobein, Karlsruhe
Greiner, Nürtingen
Greiner, Nürtingen

Bestrahlungsquelle:

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

Radiochemikalien:

D-threo-(dichloracetyl-1- ¹⁴ C)- Chloramphenicol (7.4 MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
³² P Orthophosphat, 'Phosphorus 32' (370 MBq/ml, ~370 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
L- ³⁵ S-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
¹⁴ C-methylierte Proteine (14.3; 30; 46; 69; 97.4; 200 kD)	Amersham, Braunschweig
α- ³⁵ S-dATP (296 MBq/ml, >22 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig

Antikörper:

Preimmun-Serum:

Kaninchenserum, vor der Immunisierung der Tiere gewonnen

Fos-Antikörper X4B:

Kaninchenserum gegen ein, in Bakterien exprimiertes, β-Gal-Fos-Fusionsprotein (AS 52-252 des FBR-fos (van Beveren et al., 1983) und AS 275-316 des FBJ-fos (van Beveren et al., 1984)); zur Verfügung gestellt von H.J. Rahmsdorf, Karlsruhe.

Jun Antikörper Ab-1:

Affinitätsgereinigtes Kaninchenserum gegen ein Peptid aus dem v-Jun (AS 209-225) (Angel et al. 1988a); gekauft bei dianova, Hamburg.

Jun Antikörper 891:

Kaninchenserum gegen ein Peptid aus dem c-Jun (AS 47-59) (Angel et al., 1988a); zur Verfügung gestellt von A. Darling, Glasgow.

Glucocorticoid-Rezeptor-Antikörper:

Kaninchenserum gegen ein Peptid aus dem Glucocorticoid-Rezeptor (AS 440-795) (Hoech et al., 1989); zur Verfügung gestellt von B. Groner, Basel.

Bakterien und Zellen

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

F9 tk⁻: embryonale Maus-Karzinoma-Zelle. Erhalten von E. Wagner, Heidelberg.
(im Nachfolgenden nur mit F9 bezeichnet)

Hela tk⁻: Menschliche Cervix-Karzinoma-Zelle. Erhalten von Dr. Yung-Chi-Chung,
Durham. (im Nachfolgenden auch mit HeLa bezeichnet)

GM 637: mit Simian Virus (SV40) transformierte humane Hautfibroblasten

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 K₂HPO₄,
17 mM KH₂PO₄

SOB:

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

SOC:

SOB mit 20 mM Glucose

Bakterien-Selektionsmedium:

L-Broth oder TB mit 100 µg/ml Ampicillin

Einfrier-Medium (Bakterien):

90% L-Broth, 10% DMSO

Kulturmedium für HeLa tk⁻, GM637:

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

Kulturmedium für F9:

DMEM-F12 (1:1) mit 2 mM Glutamin, 10⁻³ M β-Mercaptoethanol, 10% FCS, 100 U/ml
Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Phosphatfreies Medium:

DMEM ohne Phosphat

Methioninfreies Medium:

RPMI ohne Methionin

Einfrier-Medium (Zellkultur):

80% Medium, 10% FCS, 10% DMSO

Plasmid Konstruktionen:

Die Expressionsvektoren für die c-Jun und v-Jun Mutanten (RSV-c-Jun Δ 6/223; RSV-c-Jun Δ 146/221; RSV-v-Jun Δ 6/44; RSV-v-Jun Δ 6/61 und RSV-v-Jun Δ 6/91) wurden von P. Angel, Karlsruhe, zu Verfügung gestellt. Die genaue Klonierung ist bei Angel et al., 1989 beschrieben. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der Mutanten.

Der CMV-c-Jun Δ 89/91 Expressionsvektor wurde von M. Birrer, National Cancer Inst., Bethesda MD, USA, (unveröffentlicht) zur Verfügung gestellt. Eine schematische Darstellung ist ebenfalls in Abbildung 10 zu sehen.

Die Expressionsvektoren für c-Fos und c-Jun, die ebenfalls unter der Kontrolle des RSV LTR stehen (RSV-c-Fos, RSV-c-Jun) wurden von R. Offringa, Leiden, Niederlande, zur Verfügung gestellt (Offringa et al., 1990). RSV-neo ist von RSV-CAT (Gorman et al., 1982a) abgeleitet, wobei die CAT-Sequenzen gegen ein offenes Leseraster aus dem Neomycin (neo) Gen ausgetauscht wurden.

RSV-0 ist ein Kontrollvektor, der keine gencodierenden Sequenzen besitzt und durch Deletion eines Sall, XhoI Fragments aus dem RSV-JunB Expressionsvektor entstanden ist (Yang-Yen et al., 1990). Er wurde von P. Angel zur Verfügung gestellt.

Die Vektoren p 17M-tk-cat und p GAL4ER(EF) wurden von P. Chambon zur Verfügung gestellt (Webster et al., 1988; Webster et al., 1989). Der Vektor GAL4 wurde von P.A. Baeuerle zur Verfügung gestellt (Schmitz und Baeuerle, 1991). Er enthält lediglich die DNA Bindedomäne des GAL4 Proteins unter der Kontrolle eines RSV Promotors.

Ausgangsplasmid für die c-fos Mutanten war das RSV-c-Fos-GHF1 Plasmid (ebenfalls von P. Angel zur Verfügung gestellt; Angel et al., 1989). Das RSV-cFos- Δ 238 Plasmid entstand durch StuI, XhoI Verdau von RSV-c-Fos-GHF1 (StuI schneidet bei Position 709 (van Beveren et al., 1983) im c-fos Gen; XhoI schneidet im GHF1 Gen), Auffüllen der Schnittstellen, Abtrennung des herausgeschnittenen Fragments und Religation des Plasmids. Das RSV-cFos- Δ 316 Plasmid entstand durch NcoI, XhoI Verdau von RSV-c-Fos-GHF1 (NcoI schneidet bei Position 943 im c-fos Gen), Auffüllen der Schnittstellen, Abtrennung des herausgeschnittenen Fragments und Religation des Plasmids. Das RSV-cFos- Δ 328 Plasmid entstand durch BstEII, XhoI Verdau von RSV-c-Fos-GHF1 (BstEII schneidet bei Position 980 im c-fos Gen), Auffüllen der Schnittstellen, Abtrennung des herausgeschnittenen Fragments und Religation des Plasmids. Das RSV-c-Fos- Δ 373 Plasmid entstand durch Ligation eines 1kb langen BglII, Sall Fragments aus dem mus-fos-3'SacI Plasmid in das, mit BglII und XhoI aufgeschnittene, RSV-c-Fos-GHF1

Plasmid (BglIII schneidet bei Position 152 im c-fos Gen; SalI schneidet unmittelbar 3' hinter der für c-Fos codierenden Sequenz im Polylinker). Eine schematische Darstellung der deletierten RSV-c-Fos Konstrukte ist in Abbildung 14 zu sehen.

Der mus-fos-3'SacI Vektor wurde von P. Angel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Er entstand durch Verdau des p GEM fos 3 Konstruktes mit SacI, BamHI Linker Ligation, Verdau mit BamHI und Religation des Vektors.

Der GEM fos 3 Vektor wurde von M. Greenberg und J. Belasco, Boston MA, zur Verfügung gestellt. P GEM fos 3 enthält eine vollständige Maus c-Fos c-DNA.

Die chimären Konstrukte aus der DNA Bindedomäne des Hefe Transkriptionsfaktors GAL4 und den c-Fos Mutanten wurden mit Hilfe eines Zwischenproduktes, GAL4-mus-fos- Δ 3'SacI, kloniert. Dieses entstand durch Aufschneiden des mus-fos- Δ 3'SacI mit AvaI, Auffüllen der Schnittstellen, XhoI Linker (10 bp lang) Ligation, Nachschneiden mit EcoRI und XhoI. In dieses Plasmid wurde ein 220bp langes XhoI, EcoRI Fragment aus dem Gal ER(EF) Plasmid (Webster et al., 1989), das die AS 1-147 von GAL4 enthält, eingesetzt. Aus dem so entstandenen GAL4-mus-fos- Δ 3'SacI Plasmid wurde mit HindIII, BglIII ein 350 bp langes Fragment isoliert, daß die GAL4 Bindedomäne enthält, und über BglIII in das c-fos Gen eingesetzt werden konnte. Hierzu wurden die verschiedenen RSV-c-Fos Mutanten (Δ 373, Δ 328, Δ 316, Δ 238) mit HindIII, BglIII aufgeschnitten, das Fragment abgetrennt und das entsprechende Fragment aus dem GAL4-mus-fos- Δ 3'SacI eingesetzt. Die entstandenen Plasmide heißen RSV-GAL4-c-Fos- Δ 373, RSV-GAL4-c-Fos- Δ 328, RSV-GAL4-c-Fos- Δ 316, RSV-GAL4-c-Fos- Δ 238)

Der RSV-GAL4-c-Fos Wildtyp entstand durch Ligation eines 1 kb langen BglIII, PvuII Fragmentes aus dem p GEM fos3 Plasmid in den, mit BglIII und StuI aufgeschnittenen, RSV-GAL4-c-Fos- Δ 316.

METHODEN

1. Behandlung von Nucleinsäuren

Spektrophotometrische Konzentrations-Bestimmungen von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäure 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.

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

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

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

Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung der Nucleinsäure-Lösung von Proteinen wurde mit Wasser auf mindestens 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1x TNE gesättigt; 1x 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 Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die Nucleinsäure-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 - 5 μg tRNA als Fällungshilfe zufügen. Nach Zugabe des 2.5 fachen Volumen Ethanol wurde 30 min bei -80°C oder 2 Stunden bei -20°C gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 13000xg zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag nochmal mit 80% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Präzipitate unter Vakuum getrocknet.

Das Volumen der Nukleinsäure-Lösung kann auch durch 2-Butanol eingeeengt 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 0.5 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 NH₄Acetat benutzt. Eine quantitative Abtrennung dieser kleinen Moleküle ist aber nicht möglich.

2. DNA Präparation

Plasmid DNA Präparation (Birnboim et al., 1979)

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

Die über Nacht inkubierten Bakterien Suspension wurde 10 min bei 4000xg 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. Ausgefallenes Protein und genomische DNA wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 16800xg (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 16800xg (4°C) zentrifugiert, getrocknet und in 10 ml 0.1 M NaAcetat, 50 mM Tris pH 8 gelöst. Nach anschließender zweiter Ethanol-fällung 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 16800xg (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 4000xg 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 wurden 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 13000xg 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 1x Universal-Verdaupuffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) mit dem entsprechendem 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 5x Glycerin-Probenpuffer (1x: 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 1x CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , 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_2O , 10 μl 10x TNE (1x: 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 1x Linker-Kinase-Puffer (66 mM Tris pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 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 1x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7.5, 7 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl) versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. 3' Überhänge werden bei dieser Prozedur abgebaut.

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 1x Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl_2 , 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 wurden 2 µl des phosphorylierten Linkers benutzt.

4. 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 µl. Das Gel ist völlig von Puffer bedeckt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1x TBE (90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgekocht. Für "low-melting" Gele wurde Agarose Typ VII verwendet. Nach Zugabe von 1.5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Entfernen des Kamms und Eingießen des Laufpuffers (1x 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 14x15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Kunststoff-Abstandshaltern gegossen. Für ein 6% Gel benötigt man 6 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung, die mit 3 ml 10x TBE (1x: 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 µl TEMED und 250 µl 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 1x 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 1x TBE mit 1 µg/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 20x39 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 poliert. Auf die ungeschnittene Glasplatte wurde eine Mischung von 3.3 ml Haftsilan und 100 µl 100% Essigsäure gleichmäßig verteilt und drei Minuten trocknen gelassen. Nach Abspülen mit Ethanol wurde die Glasplatte ebenfalls gut 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 10x TBE (1x: 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 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 0.5x 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 mit Dimethyldichlorsilan-Silan beschichtete Glasplatte abgehoben. Durch sofortiges Einlegen

in 10% Essigsäure für 10 bis 15 min wurde der Harnstoff herausgelöst. Das Gel wurde dann nach Spülen mit Wasser für etwa eine Stunde bei 80°C auf der Glasplatte getrocknet bei -80°C autoradiographiert.

5. Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit dem "T7-Sequense-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 -³⁵S-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.

6. 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 MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 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 E₅₅₀ ~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 1000xg (4°C) zentrifugiert und das Medium gut entfernt. Die beiden Niederschläge wurden in je 10 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 3 mM H₂CoCl₃, 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 1000xg (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 in 600 µl Portionen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die Transformationseffizienz liegt bei etwa $1-5 \times 10^6$ Kolonien pro µg "supercoiled" pBR322.

Transformation von kompetenten Zellen

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 MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension wurden danach 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 entfernt. Nach Erstarren des Agar wurden die Platten bei 4°C gelagert.

7. Zellen trypsinieren, einfrieren und auftauen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 95% relative Feuchte inkubiert. Eine subkonfluente Kulturflasche wurde nach Waschen mit 10 ml kaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄, 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 330xg zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium aufgenommen, so daß die Zellzahl $2-5 \times 10^6$ /ml betrug. Je 1 ml wurden in Einfrierröhrchen abgefüllt und 30 min auf Eis gestellt. Nach zwei Stunden bei -20°C und einem 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 330xg abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml Medium resuspendiert und in eine 80 cm^2 Kulturflasche mit 10 ml Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmal gewechselt.

8. Transiente Transfektion und Behandlung von Zellen mit Induktoren

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

HeLa wurden mit 1.3×10^6 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 1x TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM Na_2HPO_4) gewaschen. Nach Absaugen des TBS wurde 1 ml DNA-DEAE-Dextran-Mischung (10 μg DNA, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DEAE-Dextran in 1x 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 1x TBS gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit PBS (123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) gewaschen und dann 10 ml frisches Medium (0.5% FCS) zugegeben.

CaPO_4 -Methode (Graham und van der Eb, 1973)

F9 wurden, falls nicht anders angegeben, mit 8×10^5 Zellen pro Petrischale 12 Stunden vor Transfektion angesetzt. Drei Stunden vor der Transfektion wurden das Medium nochmal gewechselt. Für die Herstellung des Präzipitates wurde zu 10 μg DNA in 475 μl 1x HBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM D-Glucose, 21 mM HEPES pH 7.10) tropfenweise 25 μl 2.5 M CaCl_2 zugegeben. Das Präzipitat wurde 20 bis 25 min bei RT stehen gelassen. 475 μl 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 Na_2HPO_4 ,

2.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) gewaschen und frisches Medium (DMEM mit 0.5% FCS) zugegeben.

CaPO₄-Methode (modifiziert nach Chen-Okayama, 1987)

2.5×10^5 GM637 Zellen wurden pro 3 cm Petrischale 24 Stunden vor Transfektion angesetzt. Drei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium nochmals gewechselt. Für die Herstellung des Präzipitates wurden 8 μg DNA in 500 μl 250 mM CaCl_2 Lösung aufgenommen. Dazu wurden tropfenweise 500 μl 2xPBS Puffer (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4) gegeben. Das Präzipitat wurde 20 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden 500 μl dieser Mischung tropfenweise in das Medium, der zu transfizierenden Zellen, verteilt. Nach 12-16 Stunden Inkubation bei 35°C und 3% CO_2 wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen, und anschließend mit frischem Medium (DMEM mit 0.5% FCS) inkubiert (37°C und 6% CO_2).

Induktion von Zellen

Die Induktion von Zellen mit TPA (Endkonzentration: 80 ng/ml) erfolgte durch direkte Zugabe der Substanz ins Medium. Bei UV-Bestrahlungen wurden die Zellen nach Waschen mit PBS ohne Puffer oder Medium in der Petrischale mit offenem Deckel mit 30 J/m^2 bestrahlt. Bei Markierungsexperimenten mit ^{32}P Orthophosphat wurden die Zellen statt PBS mit TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM Na_2HPO_4) ohne Na_2HPO_4 gewaschen.

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

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit Induktoren wurden die Zellen einer Petrischale für den CAT-Assay geerntet. Dazu wurden sie zweimal mit 10 ml 1x TBS gewaschen und in 1 ml 1x TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM Na_2HPO_4) mit einem Gummischaber abgeschabt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 3000xg wurde das Zellpellet in 100 μl 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 13000xg 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% Na₂CO₃, 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 (100 ml Lowry-Reagenz I mit 1 ml 2% NaK-Tartrat und 1 ml 1% CuSO₄) 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 ¹⁴C-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 bei -80°C über Nacht autoradiographiert.

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 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 pmolxmg⁻¹xmin⁻¹ berechnen, da bekannt ist, wieviel pmol ¹⁴C-Chloramphenicol eingesetzt wurde (7000 pmol), wieviel Substrat in 120 min acetyliert wurde und welche Proteinmenge eingesetzt wurde.

10. Extrakt Präparation aus eukaryontischen Zellen

Herstellung eines Zellysates aus radioaktiv markierten Zellen

Die Herstellung der Zellysate war für alle Ansätze gleich, unabhängig von der Markierung oder den unterschiedlichen Induktionen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Sämtliche Puffer waren eisgekühlt. Die Zellen einer 6 cm (3 cm) Petrischale wurden nach Ablauf der Induktionszeit 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 800 (400) µl RIPA Puffer (50 mM Tris p.H. 8; 125 mM NaCl; 0.5% NP40; 0.5% NaDOC; 0.1% SDS) plus Proteinase Inhibitormix (Endkonzentration: 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin A; 1 µg/ml Aprotinin; 0.5 mM PMSF) plus Phosphatase Inhibitormix (Endkonzentration: 2 mM ZnCl₂; 10 mM NaF; 10 mM Natriumpyrophosphat; 20 mM Na₂MO₄) plus 10 mM Para-nitrophenyl-phosphat, einen Phosphataseindikator, der sich in Anwesenheit von Phosphatasen gelb färbt, abgeschabt. Das Zellysat wurde 30 min bei 2°C mit 120000xg in einer Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden entweder in einem Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren und bei -80°C aufbewahrt oder direkt in eine Immunpräzipitation eingesetzt.

11. Proteingele

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

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein 10%iges Acrylamid-Gel mit einem 5%igen Kammgel benutzt, das zwischen zwei 14x15 oder 23x15 cm Glasplatten gegossen wird. Die Glasplatten wurden durch 1 mm dicke Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennt. Für 40 ml einer 10%igen Trenngellösung 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 zweimaligem Spülen mit Wasser mit einem Papier getrocknet. Für das 5%igen 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 μ l TEMED sowie 100 μ l 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 1x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3) ausgespült. Das Gel wurde dann senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 400 ml 1x 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 40 mA (mit Kühlung durch einen Ventilator) zur Auftrennung im Trenngel bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Bande aus dem Gel. Die größeren Gele wurden über Nacht bei 80 V gefahren. Falls die Proteine im Weiteren nicht auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden, wurde das Gel auf 3MM-Filterpapier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und in einer Geltrockner-Apparatur bei 80°C getrocknet. Das auf dem Filterpapier festgetrocknete Gel wurde direkt bei -80°C autoradiographiert.

Gele mit ^{35}S -markierten Proteinen wurden vor dem 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.

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 Wechsel der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren.

12. Metabolische Markierung von Proteinen

Markierung mit ^{35}S Methionin

Eine Petrischale mit 6 (3) cm Durchmesser wurde mit 1×10^6 (3.5×10^5) Zellen angesetzt und nach 24 Stunden wurden die Zellen für nochmals 24 Stunden mit 0.5% FCS

gehungert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS (123 mM NaCl; 17 mM Na₂HPO₄; 2.5 mM KH₂PO₄; pH 7.3) gewaschen. Es wurden drei verschiedene Ansätze gewählt, um die Proteine metabolisch zu markieren. Die Mengen an zugesetztem Medium und ³⁵S Methionin waren in allen Ansätzen gleich. Die Induktion erfolgte mit verschiedenen Induktoren und für unterschiedlich lange Zeit. (1) Die Zellen wurden für 1 Stunde mit 1.5 (0.8) ml methioninfreiem Medium inkubiert. Danach wurden 4.625 MBq ³⁵S Methionin pro ml Medium zugesetzt, die Zellen für weitere 2 Stunden inkubiert und anschließend induziert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank in einer separaten Box, die eine Petrischale mit Aktivkohle enthielt. Die Aktivkohle bindet flüchtige ³⁵S markierte Zersetzungsprodukte, die durch radiochemische Zersetzung der Aminosäuren entstehen. (2) Die Zellen wurden nicht in methioninfreiem Medium vorinkubiert. Die Zugabe von 4.625 MBq ³⁵S Methionin pro ml Medium erfolgte gleichzeitig mit dem Wechsel zu methioninfreiem Medium. Die Inkubationsdauer betrug 3 Stunden. Anschließend wurden die Zellen induziert. (3) Die Zellen wurden 1 Stunde mit methioninfreiem Medium vorinkubiert und anschließend für 20 min induziert. Danach wurde ³⁵S Methionin zugegeben und die Zellen weitere 1.5 Stunden inkubiert. Die ersten beiden Methoden dienen dazu, Proteine im nichtinduzierten Zustand zu markieren, während die dritte Methode die, nach Induktion neusynthetisierten, Proteine radioaktiv markiert.

Markierung mit ³²P Orthophosphat

Die Zellen wurden entsprechend der ³⁵S Methionin Markierung angesetzt und weiterinkubiert. Nachdem sie für 24 Stunden in 0.5% FCS gehungert worden waren, wurden sie 2x mit phosphatfreiem TBS Puffer (137 mM NaCl; 25 mM Tris p.H. 7.4; 5 mM KCl; 0.7 mM CaCl; 0.5 mM MgCl) gewaschen und anschließend für 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin inkubiert. Daraufhin wurden pro ml Medium 18.5 MBq ³²P Orthophosphat zugesetzt und die Zellen für weitere 2.5 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Induktoren für unterschiedlich lange Zeit.

Markierung von transient exprimierten, exogenen Proteinen

Die Zellen wurden 24-36 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 4.625 MBq ³⁵S Methionin pro ml methioninfreiem Medium versetzt und 3 Stunden weiterinkubiert. Danach erfolgte eine 15 minütige Induktion der Zellen. Auf diese Weise konnten Modifikationen an transient exprimierten Proteinen untersucht werden.

Zur Markierung mit ^{32}P Orthophosphat wurden die Zellen 24-36 Stunden nach Transfektion mit phosphatfreiem TBS gewaschen, für 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium inkubiert und anschließend mit 18.5 MBq ^{32}P Orthophosphat pro ml Medium für 2.5 h markiert. Induziert wurde wiederum für 15 min.

13. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation kann in zwei Teile untergliedert werden. (1) Kopplung der Antikörper an Protein A Sepharose. Hierzu wurden pro Ansatz 20 μl Protein A Sepharose (1:2 in TSA (10 mM Tris p.H. 8.0; 140 mM NaCl; 0.025% NaN_3)) zweimal mit RIPA Puffer gewaschen und danach jeweils für 15 Sekunden bei 10000xg abzentrifugiert. Anschließend wurden 600 μl RIPA Puffer, plus Proteinase und Phosphatase Inhibitormix, und Antikörper zugesetzt und die gesamte Mixtur für mindestens 2 Stunden, bis über Nacht bei 4°C rotiert. Bei den Antikörpern handelte es sich um Seren aus nicht immunisierten (Preimmun-Serum) oder immunisierten Kaninchen. In der Regel wurden pro Versuchsansatz 2 μl Antikörper zugesetzt. Nach der Vorinkubation wurde das Gemisch zweimal mit RIPA Puffer gewaschen. Die Antikörper sind nun an die Protein A Sepharose gebunden und können auspräzipitiert werden. (2) Inkubation des Zellysates mit den, an die Protein A Sepharose gekoppelten, Antikörpern. Unterschiedliche Mengen des Zellysates wurden mit den, an die Protein A Sepharose gekoppelten, Antikörpern zusammen bei 4°C rotiert. Das Mindestvolumen betrug 400 μl . Entsprechend wurde, falls notwendig RIPA Puffer zugesetzt. Das Zellysat wurde zunächst eine Stunde mit Preimmun-Serum inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose Kügelchen 15 Sekunden bei 10000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals für 2 Stunden mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Danach wurde die Sepharose wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend nochmals einer Immunpräzipitation unterzogen oder bei -80°C weggefroren. Die Vorinkubation mit Preimmun-Serum diente dazu, unspezifisch bindende Bestandteile des Zellysates abzufangen und ermöglichte es, durch Vergleich der präzipitierten Proteine, die für das Immuneserum spezifischen Proteine zu identifizieren. In einigen Versuchen, speziell im Falle der ^{32}P Orthophosphat Markierung, wurde auf die Vorinkubation mit Preimmun-Serum verzichtet. Die Protein A Sepharose Präzipitate wurden viermal mit RIPA Puffer und einmal mit PBS gewaschen, dazwischen 15 Sekunden bei 10000xg abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden das Präzipitat mit einer Kanüle (0.4 x 21) trockengesaugt und mit 20 μl Lämmli Probenpuffer (62.5 mM Tris p.H. 6.8; 10% Glycin; 2% SDS; 5% β -Mercaptoethanol; 0.02% Bromphenolblau) versetzt. Die Proben wurden 5 min gekocht, anschließend sofort auf Eis gestellt und nach dem Abkühlen eine

Minute bei 10000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 10% iges SDS-AA-Gel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit PPO aktiviert, getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert. Keine Aktivierung mit PPO erfolgte, wenn die Proben mit ^{32}P markiert waren und/oder Proteine anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und weiter analysiert wurden.

Dephosphorylierung von immunpräzipitierten Proteinen (Müller et al., 1987)

Die Dephosphorylierung erfolgte an der Protein A Sepharose. Hierzu wurden die Präzipitate nach der Immunpräzipitation zunächst dreimal mit RIPA Puffer gewaschen und dann zweimal mit Phosphatase Puffer (40 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8, 3 mM MgCl_2). Anschließend wurden die Proben in 100 μl Phosphatase Puffer mit 20 U alkalischer Phosphatase für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Präzipitate wurden danach noch zweimal mit PBS gewaschen, mit einer Kanüle trockengesaugt und in Lämmli Probenpuffer aufgenommen. Danach wurden sie aufgekocht und in einem SDS-AA-Gel aufgetrennt.

14. Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose

Mit Hilfe der Blot Technik werden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die transferierten Proteine können auf der Membran angefärbt oder mit einem Antikörper (Western Blot) nachgewiesen werden. Außerdem können die Proteine aus der Membran herausgelöst und weiter analysiert werden (siehe Peptid Analyse). Für den Transfer der Proteine auf die Membran existieren verschiedene Methoden. Allen Methoden gemeinsam ist, daß die Proteine mit Hilfe eines elektrisches Feldes aus dem Gel heraus eluiert und auf die Membran übertragen werden.

Methode der Wahl war die 'Feucht Blot Methode'. Der Zusammenbau der Transfereinheit erfolgte unter Puffer (Transferpuffer: 50 mM Tris; 380 mM Glycin; 0.1% SDS; 20% Methanol). Eine Transfereinheit bestand aus einem 2 mm dicken porösen Schwamm auf welchen zwei Lagen puffergetränktes Whatmann 3MM-Filterpapier gelegt wurden. Als nächstes folgt die Membran, welche vorher in Transferpuffer äquilibriert worden war. Auf die Membran wurde das Gel gelegt, darauf wiederum zwei Lagen Whatmann 3MM-Filterpapier und ein poröser Schwamm. Die Transfereinheit wurde vertikal in eine

Blotkammer eingespannt. Die Blotkammer war vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Die Membran war zur Anode hin ausgerichtet. Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte von der Kathode zur Anode bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Spannung von 40 Volt über Nacht.

15. Peptid Analyse (Scheidtmann et al., 1982; Boyle et al., 1991)

Die Peptid Analyse ermöglicht u.a. (1) den Verwandtschaftsgrad von zwei ähnlichen Proteinen festzustellen, (2) ein Protein bzw. ein Peptid teilweise zu sequenzieren oder (3), wie im Fall der vorliegenden Arbeit, die Analyse von posttranslationalen Modifikationen an Proteinen. Das zu untersuchende Protein wird hierzu mit spezifischen Proteasen (bspw. Trypsin, Chymotrypsin, V8 Protease) in Peptide aufgespalten. Die Peptide können in einem SDS-Acrylamidgel, mit Hilfe der HPLC oder durch 2-dimensionale Auftrennung auf Dünnschichtplatten analysiert werden. Letztere Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. Dabei werden die Peptide in der ersten Dimension (Elektrophorese) aufgrund ihrer Ladung und Größe und in der zweiten Dimension (Chromatographie) aufgrund ihrer Hydrophobizität und Größe aufgetrennt.

Aufarbeitung des Proteins

Zur Aufreinigung der zu untersuchenden Proteine wurden zunächst Immunpräzipitationen aus ^{32}P oder ^{35}S Methionin markierten Zellen durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde auf einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blot autoradiographiert. Die, mit Hilfe des Autoradiogramms identifizierten, spezifischen Proteinbanden wurden aus der Nitrozellulose-Membran ausgeschnitten. Das Nitrozellulosestück wurde zunächst für 30 min bei 37°C mit 0.5% PVP 360 in 100 mM Essigsäure inkubiert. Dies verhinderte die unspezifische Anlagerung von Proteasen an die Nitrozellulose. Anschließend wurde das Nitrozellulosestück mit H_2O und einer frisch angesetzten 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7.8) Lösung gewaschen. Der Verdau des Proteins erfolgte an der Nitrozellulose in 150-400 μl einer 50 mM NH_4HCO_3 Lösung mit 5 μg Protease (Trypsin oder Chymotrypsin) für 5 Stunden und nochmaliger Zugabe von 5 μg Protease über Nacht. Die aufgespaltenen Peptide lösten sich von der Nitrozellulose ab und befanden sich in der Lösung. Die Nitrozellulose wurde anschließend kurz abzentrifugiert und die Lösung mit den Peptiden in eine neues Reaktionsgefäß transferiert. Danach wurde das Nitrozellulosestück mit

einem ml H₂O gewaschen und der Überstand zu der Peptidlösung pipetiert. Die gesamte Lösung wurde gut vermischt und anschließend lyophilisiert. Das nach der Lyophilisierung vorhandene Pellet, welches zum größten Teil aus NH₄HCO₃ besteht, wurde in einem Milliliter H₂O aufgenommen, gut vermischt und nochmals lyophilisiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis kein Pellet mehr sichtbar war. Im Regelfall war dies dreimal. Damit war sichergestellt, daß sich kein NH₄HCO₃ mehr in der Probe befand. Im nächsten Schritt wurden die Peptide mit 150 µl Perameisensäure oxidiert. Die Oxidation dient dazu Cysteine vollständig in Cysteinsäure zu überführen. Dies verhindert, daß die SH Gruppen der Cysteine in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen, was ein unterschiedliches Laufverhalten der Peptide zur Folge haben könnte, ohne daß Modifikationen dafür verantwortlich sind. Die Perameisensäure wurde zuvor aus 9 Teilen Ameisensäure und 1 Teil Wasserstoffperoxid hergestellt. Die Perameisensäure entsteht durch eine einstündige Inkubation der beiden Chemikalien bei Raumtemperatur. Vor der Zugabe zu den Peptiden wurde die Säure eisgekühlt. Die Oxidation der Peptide erfolgte eine Stunde lang auf Eis. Danach wurde ein Milliliter eisgekühltes H₂O zugegeben, kurz gemischt und lyophilisiert. Im Anschluß daran wurde die Probe in 300 µl Elektrophoresepuffer A (6% Ameisensäure; 1.25% Essigsäure; 0.25% Pyridin; 92.5% H₂O pH 1.9) aufgenommen und 10 min bei 10000xg abzentrifugiert um unlösliche Verunreinigungen zu pelletieren. Der Überstand wurde lyophilisiert.

Die mit ³²P markierten Proben wurden während der Probenaufbereitung direkt im Szintillationszähler gemessen. Bei ³⁵S Methionin markierten Proben wurden 10 µl der, in 300 µl Elektrophoresepuffer A gelösten, Probe mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler gemessen. Der Ablauf der Aufbereitung konnte so verfolgt werden und es konnte eine genau definierte Menge an radioaktiv markierter Probe in die 2-dimensionale Auftrennung eingesetzt werden.

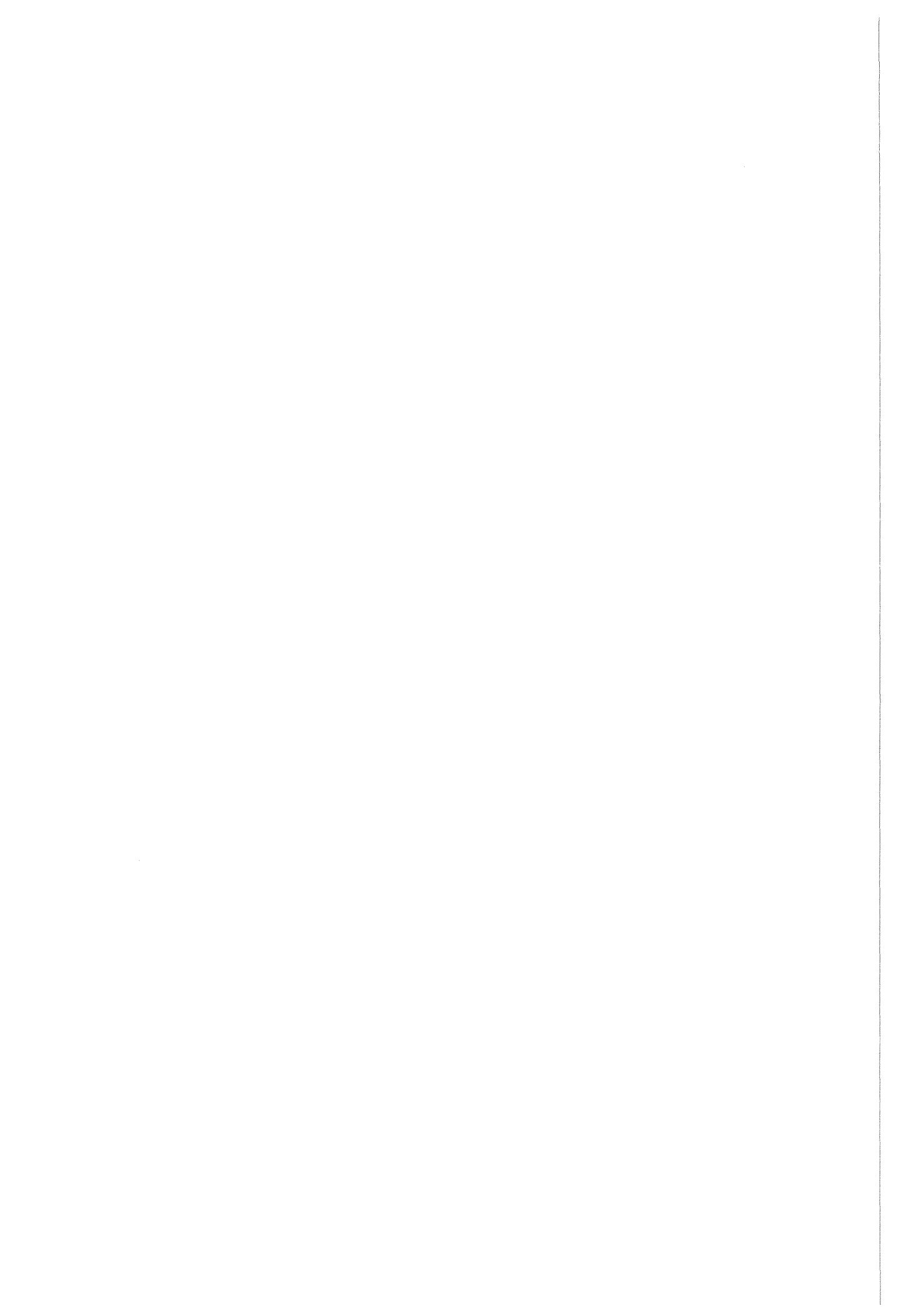
Auftrennung der Peptide

Die Probe wurde in 4-10 µl Elektrophoresepuffer A aufgenommen und 2 min bei 10000xg abzentrifugiert. 3.5 µl (800 cpm, falls möglich) wurden auf eine, mit Zellulose beschichtete, Dünnschicht-Chromatographieplatte (DC Platte) in 0.5 µl Schritten aufgetragen. Der Auftragungspunkt befand sich 2 cm vom unteren Rand entfernt in der Mitte der Platte. 2 cm vom oberen Rand in die Mitte der DC Platte wurden 2 µl einer Farblösung (1 mg/ml Xylencyanol; 5 mg/ml N-Dinitrophenyllysin) aufgetragen, mit deren Hilfe man den Verlauf der Elektrophorese verfolgen konnte. Anschließend wurden die DC Platten mit puffergetränktem Whatmann 3MM Filterpapier befeuchtet. Dabei war die

Auftragungsstelle der Probe und des Farbmärkers durch ein Loch ausgespart, so daß der Puffer von außen in den Auftragungspunkt diffundiert und die Probe zusätzlich zentriert. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoreseapparatur der Firma Camay durchgeführt. Zusammenbau und Handhabung erfolgten gemäß der Herstelleranleitung. Die Laufzeit betrug 25 min bei einer konstanten Spannung von 1000 V. Danach wurde die DC-Platte aus der Apparatur herausgehoben, waagrecht hingelegt und trocken gelassen.

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte durch Chromatographie. Nach dem Trocknen wurden je 3-4 DC-Platten in eine Chromatographiekammer gestellt, in der sich 150 ml Puffer (37.5 % Butanol, 25 % Pyridin, 7.5 % Essigsäure, 30 % H₂O) befanden. Nach 4.5 Stunden wurden die DC-Platten herausgenommen, waagrecht hingelegt, trocken gelassen und anschließend autoradiographiert.

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



ERGEBNISSE

Die Behandlung von Säugerzellen mit dem Tumorpromotor TPA führt zur schnellen Induktion des Kollagenase-Gens. Diese Induktion wird durch das TRE ('TPA responsive element') im Kollagenase-Promotor und den daran bindenden Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt. Schon 30 Minuten nach TPA-Induktion wurde in Zellen eine Erhöhung der Kollagenase mRNA Menge (Angel et al., 1987a; Stein, 1990) und eine erhöhte, durch Cycloheximid nicht hemmbare, Bindeaktivität an die TRE Sequenz nachgewiesen (Angel et al., 1987b; Chui et al., 1987; Stein et al., 1989). Außerdem führt die Blockierung der Proteinneusynthese nicht zu einer vollständigen Hemmung der Transkription des Kollagenase-Gens (Angel et al., 1987b; Krämer et al., 1990; Jonat et al., 1991) und zu einer ungehemmten Induktion eines multimeren TRE Enhancer Konstruktes (Stein et al., 1989; H.P. Auer, persönliche Mitteilung).

Diese Befunde zeigen, daß innerhalb von wenigen Minuten nach Behandlung der Zellen mit TPA eine erhöhte AP-1 Aktivität zur Induktion des Kollagenase Gens vorliegen muß. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 muß über die Modifikation der Einzelkomponenten von AP-1, c-Fos und c-Jun, erfolgen, da eine Neusynthese von Faktoren aufgrund der schnellen Induktion und der Unempfindlichkeit gegenüber Proteinsynthesehemmern nicht möglich ist.

1. Erfassung der Modifikationen

Zur Erfassung der aktivierenden Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun nach TPA-Behandlung von Zellen wurde das konstitutiv in den Zellen exprimierte Protein metabolisch markiert. Die Zellen wurden danach für kurze Zeit mit TPA inkubiert, anschließend lysiert und c-Fos und c-Jun mittels Immunpräzipitation aus den Zellysaten herauspräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einer SDS-AA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Modifikationen an Proteinen können zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-AA-Gel führen.

Aufgrund der Versuchsanordnung kann die Modifikationsänderung an c-Fos und c-Jun

direkt mit der erhöhten Transaktivierungsfähigkeit (d.h. der erhöhten Fähigkeit, die Transkription des Kollagenase-Gens zu induzieren) von c-Fos und c-Jun nach TPA-Behandlung von Zellen korreliert werden. Die auf diese Art erfaßten Modifikationen von c-Fos und c-Jun stellen die Endpunkte der durch TPA induzierten Signalkette in der Zelle dar und tragen zum weiteren Verständnis des Signaltransfers bei.

1.1. C-Fos und c-Jun werden nach Behandlung von Zellen mit TPA posttranslational modifiziert

Zur Markierung der konstitutiv exprimierten c-Fos und c-Jun Proteine wurden HeLa Zellen drei Stunden mit ³⁵S methioninhaltigem Medium inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit TPA induziert. C-Fos und c-Jun wurden, nach Präparation eines RIPA-Extraktes, mit spezifischen Antikörpern aus den Zellysaten herauspräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden in einem SDS-AA-Gel aufgetrennt.

Abbildung 1 zeigt die Autoradiogramme der SDS-AA-Gele. In Abb. 1a sind die mit Fos Antikörpern präzipitierten Proteine zu sehen. Die zweite Spur zeigt das Ergebnis einer Kontrollpräzipitation mit Preimmun-Serum (PIS). C-Fos aus unbehandelten Zellen (dritte Spur: Ko) läuft im Bereich von 55 kD. Bei den unterhalb des 46 kD Molekulargewichtsstandards laufenden spezifischen Banden handelte es sich um Proteine, die in der Zelle mit c-Fos komplexiert sind und bei der Immunpräzipitation kopräzipitiert werden. Sie werden als Fos assoziierte Proteine (FAP) bezeichnet (Müller et al., 1987; Franza et al., 1988; Kovary und Bravo, 1991). Dazu gehören beispielsweise c-Jun, Jun B und Fra I. Im Folgenden werden die Fos assoziierten Proteine nicht näher untersucht.

C-Fos aus Zellen, die 15 Minuten mit TPA behandelt wurden (Abb. 1a: TPA 15min), zeigt ein stark verändertes Laufverhalten gegenüber dem c-Fos Protein aus unbehandelten Zellen. Die in den Kontrollzellen vorhandene Fos Spezies wurde vollständig in eine scheinbar 8 kD schwerere Form überführt. Dagegen hat sich das Laufverhalten der FAP kaum verändert. Daß es sich bei dem Protein tatsächlich um eine modifizierte Form des c-Fos Protein aus Kontrollzellen handelt, ergibt sich aus der Spezifität des Antikörpers und aus den Versuchsbedingungen, die keine Neusynthese von Proteinen ermöglichen.

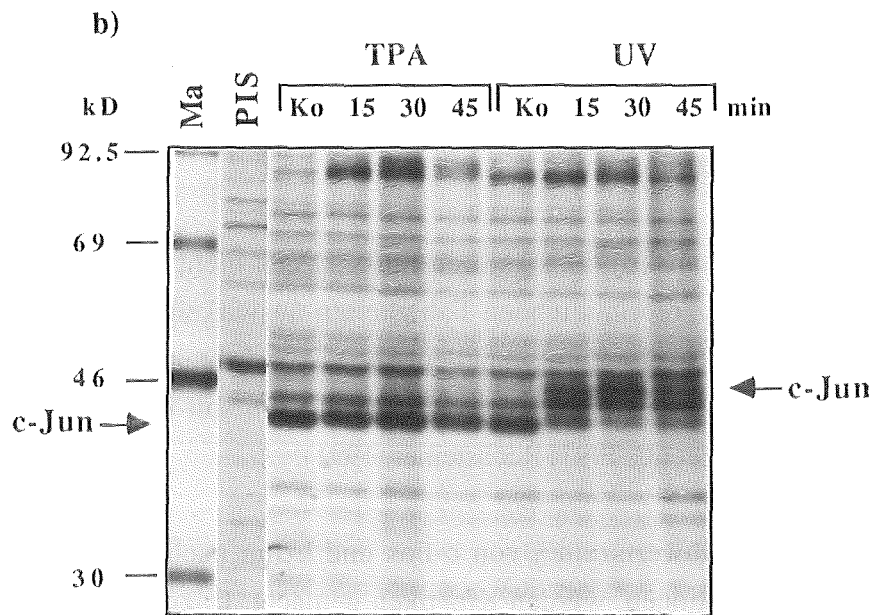
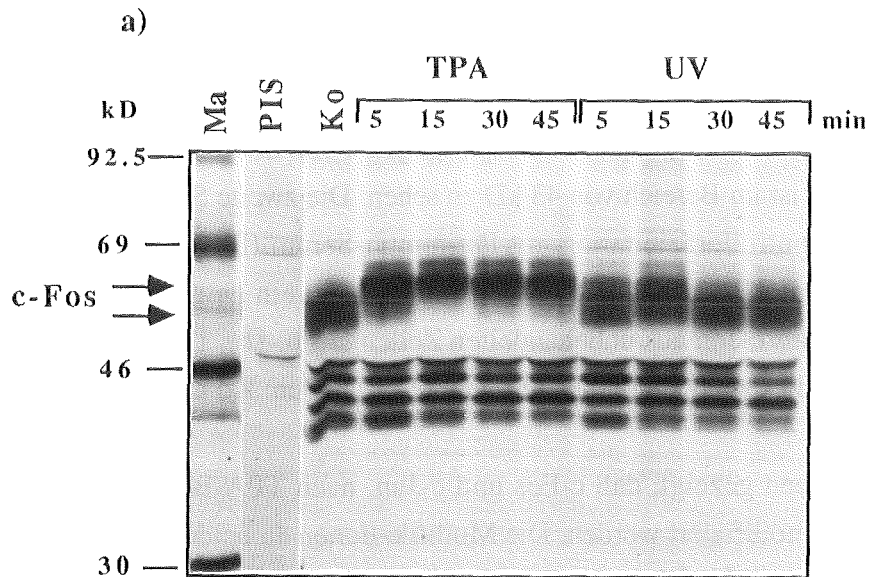


Abb. 1: TPA und UV -Behandlung führen zu einer schnellen, aber unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation von c-Fos und c-Jun. 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für drei Stunden mit $4.625 \text{ MBq } ^{35}\text{S}$ Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert und anschließend mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt oder mit UV bestrahlt (30 J/m^2). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und RIPA Extrakte präpariert. Die Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern (anti c-Fos X4B (Abb.: 1a) und anti c-Jun 891 (Abb.: 1b)) aus den Extrakten immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurden zuvor aus den gleichen Extrakten Immunpräzipitationen mit einem Preimmun-Serum (PIS) durchgeführt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden anschließend auf einem 10 %igen SDS-AA-Gel aufgetrennt, die Gele danach mit PPO aktiviert, getrocknet und autoradiographiert. Die Pfeile zeigen die unterschiedlich modifizierten c-Fos und c-Jun Proteine. Ko: Kontrolle; Ma: Molekulargewichtsmarker; kD: kilo-Dalton.

Auch c-Jun wird nach TPA-Behandlung von Zellen posttranslational modifiziert. Abbildung 1b zeigt die mit einem Antikörper gegen c-Jun immunpräzipitierten Proteine. Das c-Jun Protein ist im Bereich von 43 kD zu sehen. Die zweite Spur zeigt wiederum das Ergebnis einer Kontrollpräzipitation mit Preimmun-Serum (PIS). C-Jun aus Zellen, die für 15 Minuten mit TPA behandelt worden waren, zeigt ein langsames Laufverhalten im SDS-AA-Gel als c-Jun aus unbehandelten Zellen (Abb. 1b: TPA und Ko: 15min). In Abbildung 5a ist dies noch deutlicher zu sehen (³⁵S anti Jun: Ko und T).

Die Versuche haben gezeigt, daß c-Fos und c-Jun, nach TPA-Behandlung von Zellen, posttranslational modifiziert werden. Die Modifikationen an beiden Proteinen sind dabei offensichtlich unterschiedlich. Inwieweit diese Modifikationen tatsächlich für die Aktivierung der Transaktivierungsfähigkeit von c-Fos und c-Jun verantwortlich sind, muß im weiteren geklärt werden.

1.2. Die Modifikationen erfolgen innerhalb von nur 5 Minuten und sind mindestens 45 Minuten stabil

Modifikationen von Transkriptionsfaktoren müssen sich nicht zwangsläufig auf ihre transaktivierenden oder reprimierenden Fähigkeiten auswirken. Die Anlagerung von Ubiquitin kann beispielsweise zum schnellen Abbau von Proteinen führen (Finley und Vashavsky, 1985). Auch der Abbau von c-Fos und c-Jun soll über Ubiquitinylierung verlaufen (Ciechanover et al., 1991; Rechsteiner, 1991).

Zur Erfassung der Halbwertszeiten von c-Fos und c-Jun nach Induktion, sowie der Stabilität der Modifikationen, wurden Kinetiken gemacht. Dazu wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Behandlung mit TPA geerntet und aus dem Zellysat c-Fos und c-Jun herauspräzipitiert. Die Modifikation am c-Fos verändert sich nach 15 Minuten nicht mehr (Abb. 1a: TPA 15 min). C-Fos aus Zellen, die 5 Minuten mit TPA behandelt worden sind, zeigt einen Intermediärzustand zwischen Kontrolle und vollständiger Modifikation. Dies bedeutet, daß mehrere Modifikationen nacheinander am c-Fos Protein ablaufen. Auch c-Jun ist 15 Minuten nach TPA Zugabe wahrscheinlich schon vollständig modifiziert, wobei es allerdings schwierig ist, die Laufunterschiede genau zu erfassen (Abb. 1b: TPA).

C-Fos und c-Jun aus Zellen, die für längere Zeit mit TPA inkubiert wurden, zeigen, daß

sowohl die Proteine als auch die Modifikationen stabil sind (Abb. 1a und b, TPA: 30 und 45 min). Auch 45 Minuten nach TPA-Induktion hat noch keine Veränderung der Modifikationen am c-Fos und c-Jun stattgefunden.

Möglicherweise verdeckt gleichzeitige Neusynthese von Proteinen einen schnellen Abbau. Um diese Möglichkeit auszuschließen und um die Veränderung des modifizierten Proteins auch nach längeren Zeiten zu erfassen, wurden die Zellen unmittelbar vor der TPA-Induktion mit einem Überschuß an nicht radioaktiv-markiertem Methionin versetzt, so daß das neusynthetisierte Protein nicht mehr metabolisch markiert wurde. Es zeigte sich, daß das modifizierte c-Fos Protein mindestens 45 Minuten stabil ist (Abb. 2). C-Fos aus Kontrollzellen verändert sich auch nach zwei Stunden nicht. Während die Modifikation von c-Fos nach 120 Minuten zum größten Teil revidiert ist, hat sich die Halbwertszeit des Proteins durch die Modifikation nicht verändert (Abb. 3: 120, T).

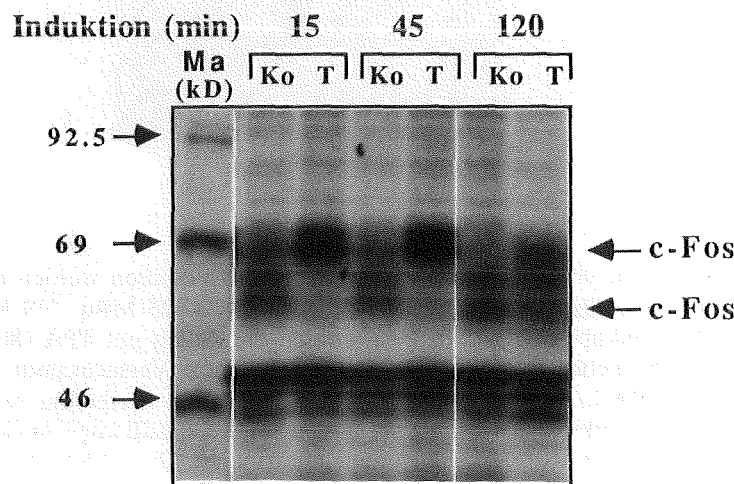


Abb. 2: Die TPA-induzierten Modifikationen am c-Fos Protein sind mindestens 45 Minuten stabil. 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für drei Stunden mit 4,625 MBq, ³⁵S Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem 2000 fachen Überschuß an nicht radioaktiv-markiertem Methionin versetzt und unmittelbar danach mit TPA (80 ng/ml Medium) induziert oder ohne Induktor weiterinkubiert (Kontrolle). Nach den angegebenen Induktionszeiten wurden die Zellen geerntet und RIPA Extrakte präpariert. Die c-Fos Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern, anti c-Fos X4B, aus den Extrakten immunpräzipitiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Abb. 2 beschrieben. Die verschiedenen c-Fos Spezies sind mit Pfeilen markiert. Ko: Kontrolle; T: TPA; Ma: Molekulargewichtsmarker; kD: kilo-Dalton.

Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn man Zellen nicht mit einem Überschuß an nicht radioaktiv-markiertem Methionin behandelt. Die Zellen sind nach der Vormarkierung,

aufgrund des Mangels an ^{35}S Methionin, nicht mehr in der Lage, neue Proteine zu synthetisieren. Daher läßt sich auch in diesem Fall die Veränderung der Modifikationen des konstitutiv exprimierten Proteins über einen längeren Zeitraum beobachten. Die in

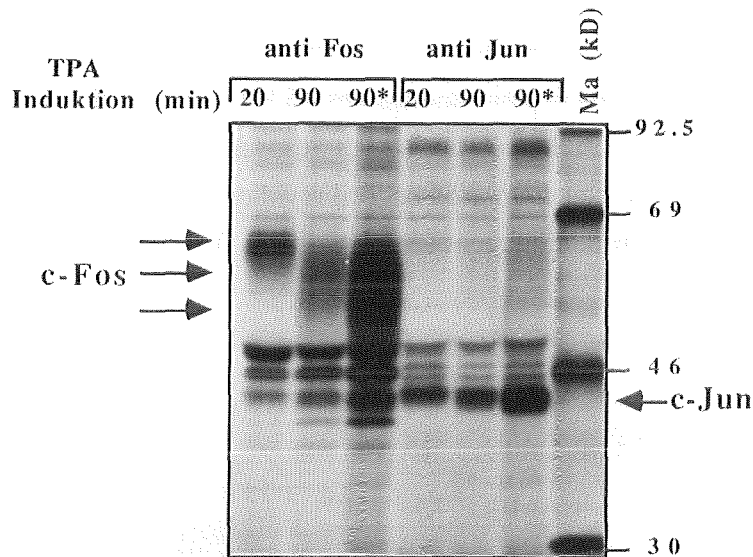


Abb. 3: Die Modifikationen von c-Fos und c-Jun nach TPA-Induktion werden nach 90 Minuten revidiert. 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für drei Stunden mit 4.625 MBq. ^{35}S Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml Medium) induziert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. In einem Versuchsansatz (90*) wurde den Zellen, gleichzeitig zur TPA-Induktion nochmals 4.625 MBq. ^{35}S Methionin zugegeben, um das neusynthetisierte Protein zu markieren. Die Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern, anti c-Fos X4B und anti c-Jun 891, aus den RIPA-Extrakten immunpräzipitiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Abb. 2 beschrieben. Die verschiedenen c-Fos Spezies sowie c-Jun sind wiederum mit Pfeilen markiert. Ma: Molekulargewichtsmarker; kD: kilo-Dalton.

Abbildung 3 gezeigten Proteine stammen aus Zellen, die nach drei Stunden Vormarkierung und anschließender TPA-Behandlung nach 20 oder 90 Minuten geerntet wurden (Abb. 3: anti Fos und anti Jun: 20 und 90 min). Im Falle von 90* wurde den Zellen zum Zeitpunkt der TPA Zugabe nochmals ^{35}S Methionin zugesetzt, um das nach Induktion durch TPA neusynthetisierte Protein zu markieren. Sowohl das modifizierte c-Fos als auch das modifizierte c-Jun wird 90 Minuten nach TPA-Induktion nicht abgebaut, sondern in eine Modifikationszustand überführt, der dem des neusynthetisierten Proteins gleicht (Abb. 3: vergleiche 90 und 90*). Wahrscheinlich werden die Proteine zu diesem Zeitpunkt durch die gleichen Enzyme modifiziert, während die Enzyme, die für

die schnelle Modifikation nach TPA Inkubation verantwortlich waren, nicht mehr aktiv sind.

Die Versuche haben gezeigt, daß die Modifikationen an c-Fos und c-Jun 15 Minuten nach TPA-Induktion abgeschlossen sind und daß die modifizierten Proteine mindestens 45 Minuten lang stabil in den Zellen vorliegen. Danach werden die durch TPA-Behandlung induzierten Modifikationen, aber nicht die Proteine, wieder abgebaut.

1.3. Unvollständige Modifikation von c-Fos in F9 Zellen

Einen weiteren Hinweis, daß die Modifikation von c-Fos nach TPA-Behandlung von Zellen mit Transaktivierungsvorgängen in Verbindung steht, geben Experimente mit F9 Teratokarzinoma-Zellen. Unbehandelte F9 Zellen besitzen keine nachweisbaren Mengen

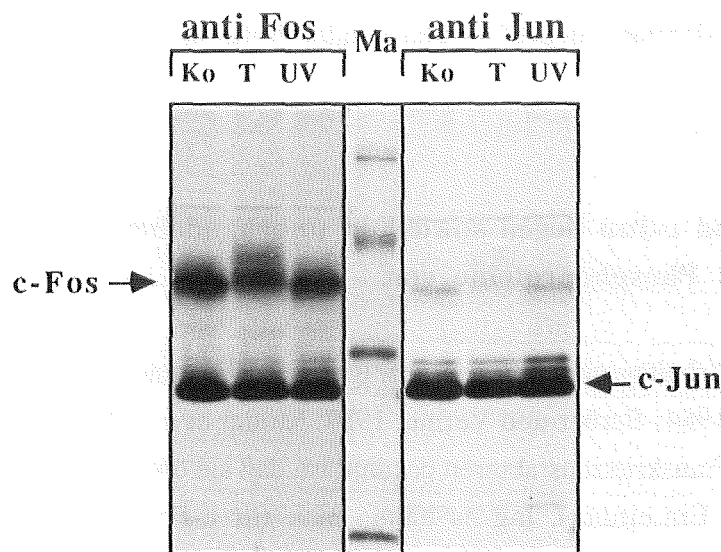


Abb. 4: TPA induzierte c-Fos und c-Jun Modifikationen in F9 Zellen. 1×10^6 F9 Zellen wurden mit 5 μg RSV c-Fos und 5 μg RSV c-Jun Expressionsplasmid transfiziert und nach 24 Stunden Inkubation mit 0.5% FCS für drei Stunden mit 4.625 MBq. ^{35}S Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ ml Medium) behandelt oder mit UV bestrahlt ($30\text{J}/\text{m}^2$) bzw. zur Kontrolle nicht induziert und nach 20 Minuten geerntet. Die Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern, anti c-Fos X4B und anti c-Jun 891, aus den RIPA-Extrakten immunpräzipitiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Abb. 2 beschrieben. Die c-Fos und c-Jun Proteine sind mit Pfeilen markiert. Ma: Molekulargewichtsmarker (die Größen entsprechen denen der vorangegangenen Abbildungen: 92.5; 69; 46; 30 kD).

an c-Fos und c-Jun Protein oder c-fos und c-jun mRNA (Rütther et al., 1985; Kryske et al., 1987; Chiu et al., 1988; Schönthal et al., 1988a). TPA führt zwar in F9 Zellen zur Induktion von c-Fos, die Zellen zeigen jedoch auch in Anwesenheit von transient exprimiertem c-Jun keine TPA-Induktion der Kollagenase (P. Angel, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise können die Zellen die Proteine nicht in der geeigneten Art und Weise modifizieren.

Um dies zu untersuchen, wurden F9 Zellen mit c-Fos und c-Jun Expressionsvektoren transfiziert, nach 24 Stunden für 3 Stunden mit ^{35}S methioninhaltigem Medium versetzt und 15 Minuten mit TPA induziert. Tatsächlich führt die TPA-Behandlung von F9 Zellen nicht zu der, aus HeLa Zellen bekannten, Veränderung des Laufverhaltens von c-Fos, sondern nur zu einem etwas verlangsamten Laufverhalten (Abb. 4: anti Fos: Ko und T). Möglicherweise findet aufgrund dieser fehlenden Modifikation keine Induktion des Kollagenase-Gens durch TPA statt. Es konnte somit auch in diesem Versuchsansatz gezeigt werden, daß die schnelle Modifikation von c-Fos nach TPA-Behandlung der Zellen für die Transaktivierung des Kollagenase Gens wichtig ist. Für c-Jun kann in diesem Zusammenhang keine eindeutige Aussage gemacht werden, da die Modifikationsänderungen in der 1-dimensionalen Auftrennung nur schwach sichtbar sind.

1.4. C-Fos und c-Jun liegen sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach Induktion als Phosphoproteine vor.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß c-Fos und c-Jun phosphoryliert sind (Curran et al., 1984; Barber und Verma, 1987; Müller et al., 1987; Franza et al., 1988). Da von vielen Transkriptionsfaktoren bekannt ist, daß sie über Phosphorylierung reguliert werden (siehe Einleitung), lag es nahe, auch für c-Fos und c-Jun einen solchen Mechanismus zu postulieren. Zum Nachweis der Phosphorylierung am konstitutiv exprimierten endogenen c-Fos und c-Jun wurden HeLa Zellen zunächst für 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium inkubiert. Dann wurde für 2.5 Stunden ^{32}P -Orthophosphat zugesetzt und anschließend für 15 Minuten mit TPA induziert. Danach wurden die Zellen geerntet und c-Fos und c-Jun aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Es zeigte sich, daß sowohl in den nicht induzierten Zellen als auch in TPA-behandelten Zellen c-Fos und c-Jun phosphoryliert sind (Abb. 5a: anti Fos ^{32}P und anti Jun ^{32}P). C-Fos aus TPA-behandelten Zellen zeigt die typische Veränderung des Laufverhaltens im SDS-AA-Gel. Die Modifikation von c-Fos führt jedoch nicht zu einer verstärkten Phosphorylierung des Proteins. Dies bedeutet, daß die Modifikation von c-Fos nach TPA-Behandlung der

Zellen nicht auf Phosphorylierung beruht oder, daß gleichzeitig mit einer Phosphorylierung auch eine Dephosphorylierung von c-Fos stattgefunden hat.

C-Jun dagegen wird nach TPA-Behandlung der Zellen verstärkt phosphoryliert (Abb. 5: anti Jun ^{32}P). Dies bedeutet, daß Phosphorylierungen an der schnellen Aktivierung von c-Jun nach TPA-Behandlung beteiligt sind.

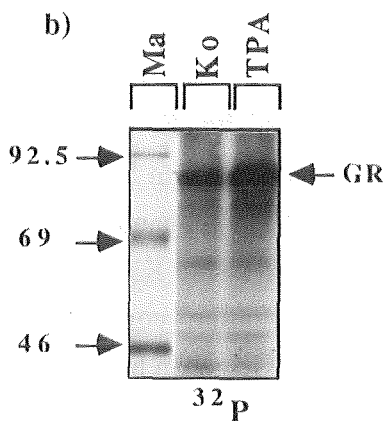
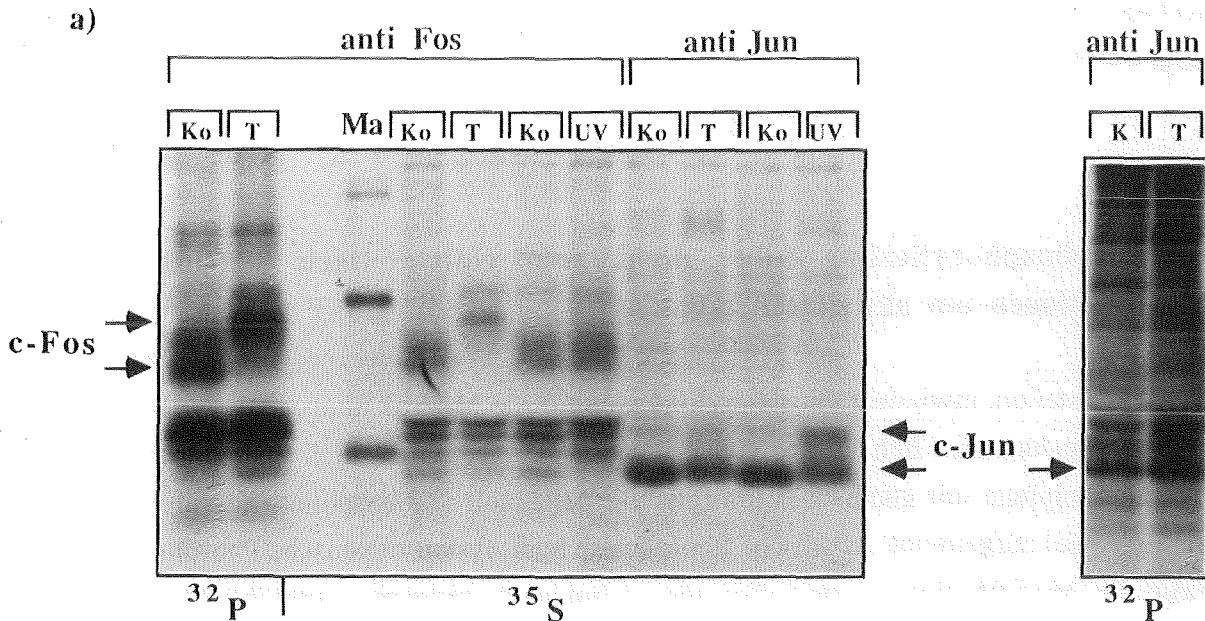


Abb. 5: Die c-Fos und c-Jun Proteine sind sowohl in unbehandelten Zellen als in TPA-behandelten Zellen phosphoryliert. ^{32}P Orthophosphat-Markierung der Proteine: 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde für 2.5 Stunden $18.5 \text{ MBq } ^{32}\text{P}$ Orthophosphat pro ml Medium zugesetzt. Danach wurden die Zellen für 20 min mit TPA (80 ng/ml Medium) induziert bzw. in der Kontrolle ohne Induktion weiterinkubiert. Die Herstellung des RIPA Extraktes und die weitere Immunpräzipitation erfolgte wie zuvor bei Abb. 2 beschrieben. Nach der Immunpräzipitation von c-Fos und c-Jun wurde noch eine zusätzliche Präzipitation mit dem Glucocorticoid-Rezeptor-Antikörper durchgeführt (Abb. 5b). Die weitere Aufarbeitung erfolgte ebenfalls wie bei Abb. 2 beschrieben.

^{35}S Markierung von Proteinen: 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für drei Stunden mit $4.625 \text{ MBq } ^{35}\text{S}$ Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert und anschließend mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt (in der Kontrolle mit dem Lösungsmittel für TPA: DMSO) oder UV (30 J/m^2) bestrahlt (zur Kontrolle wurden die Zellen in gleicher Weise, bis auf die UV-Bestrahlung, wie die induzierten Zellen behandelt). Nach 20 Minuten wurden die Zellen geerntet und wie bei Abb. 2 beschrieben, weiterbehandelt. Die c-Fos und c-Jun Proteine und der GR sind mit Pfeilen markiert. Ma: Molekulargewichtsmarker (die Größen entsprechen denen der vorangegangenen Abbildungen: 92.5; 69; 46; 30 kD); Ko, K: Kontrolle; ^{32}P : Markierung der Proteine mit ^{32}P Orthophosphat; ^{35}S : Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin.

Damit ausgeschlossen werden kann, daß in der Zelle zum Zeitpunkt der Aktivierung von c-Jun und c-Fos ein Mangel an verfügbarem ^{32}P -Orthophosphat vorliegt, wurde nachträglich auch der Glucocorticoid-Rezeptor aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Aus früheren Versuchen war bekannt, daß der Glucocorticoid-Rezeptors durch TPA-Behandlung der Zellen phosphoryliert wird (eigene unveröffentlichte Daten). In Abb. 5b sieht man die deutlich vermehrte Phosphorylierung des Glucocorticoidrezeptor nach TPA-Induktion. Das Ergebnis zeigt auch, daß in der Zelle genügend verfügbares Phosphat vorliegt, um eine zusätzliche Phosphorylierung von c-Fos und c-Jun nach TPA-Induktion zu gewährleisten.

1.5. Dephosphorylierung führt nicht zum vollständigen Verlust der Modifikationen am aktivierten c-Fos.

Um festzustellen, inwieweit Phosphorylierungen für die Modifikationsveränderung von c-Fos und c-Jun, nach Behandlung von Zellen mit TPA, verantwortlich sind, wurden die Immunpräzipitate mit alkalischer Phosphatase behandelt und anschließend auf einem SDS-AA-Gel aufgetrennt. Alkalische Phosphatase hydrolysiert organische Phosphoester. Falls die Modifikationen von c-Fos und c-Jun nach Induktion ausschließlich auf Phosphorylierungen zurückzuführen sind, sollten die aktivierten Proteine nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase im gleichen Molekulargewichtsbereich im SDS-AA-Gel laufen wie die Proteine aus den unbehandelten Zellen.

Sowohl c-Fos Protein aus Kontrollzellen als auch aus TPA-behandelten Zellen läuft nach Dephosphorylierung in einem niedrigeren Molekulargewichtsbereich im SDS-AA-Gel (Abb. 6: anti Fos). Dies war zu erwarten, da das c-Fos Protein aus unbehandelten Zellen ebenso wie das c-Fos aus induzierten Zellen phosphoryliert ist (siehe Kapitel 1.4). Es zeigte sich jedoch weiterhin ein Unterschied im Laufverhalten von c-Fos aus Kontrollzellen und induzierten Zellen. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: (1) Die Modifikation des c-Fos Proteins nach TPA-Behandlung der Zellen und die damit verbundene Veränderung des Laufverhaltens ist nicht ausschließlich auf eine Phosphorylierung des Proteins zurückzuführen, vielmehr ist eine andere Modifikation, wie beispielsweise Glykosylierung, involviert. (2) Die Hydrolyse durch die alkalische Phosphatase ist nicht vollständig. Möglicherweise führt die Induktion zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche bestimmte Phosphorylierungsstellen vor einer Hydrolyse schützt.

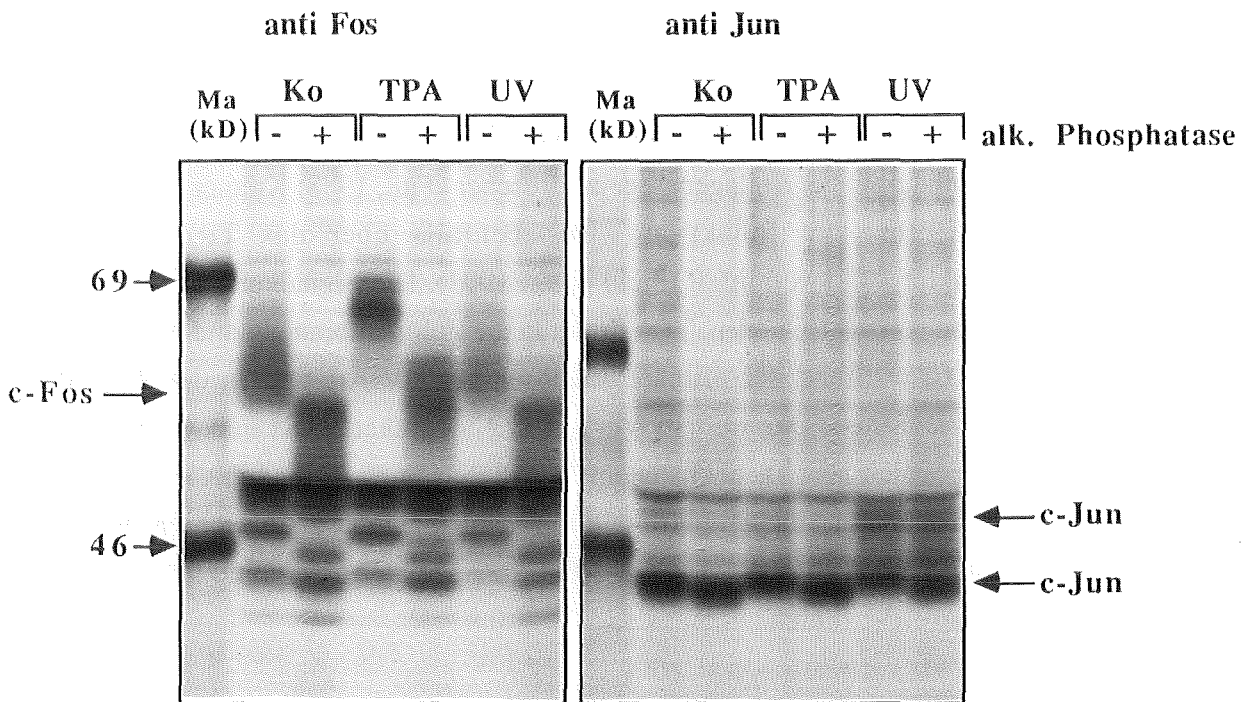


Abb. 6: Dephosphorylierung von c-Fos und c-Jun führt nicht in jedem Fall zum vollständigen Verlust der induzierten Modifikationen. 3.5×10^5 Hela tk⁻ Zellen wurden für drei Stunden mit $4.625 \text{ MBq } ^{35}\text{S}$ Methionin pro ml methioninfreiem Medium inkubiert und anschließend mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt oder UV bestrahlt (30 J/m^2). Die c-Fos und c-Jun Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern, anti c-Fos X4B und anti c-Jun 891, aus den RIPA Extrakten immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mit 20 U alkalischer Phosphatase für eine Stunde auf Eis, unter gelegentlichem Aufschütteln, inkubiert. Die Kontrollansätze wurden, mit Ausnahme der Zugabe von alk. Phosphatase, gleich behandelt. Danach wurden die Präzipitate wie bei Abb. 2 beschrieben weiterbehandelt. Die verschiedenen c-Fos sowie c-Jun Spezies sind mit Pfeilen markiert. Ma: Molekulargewichtsmarker; kD: kilo-Dalton. Die Molekulargewichtsmarker im rechten Teil der Abbildung (69 und 46 kD) sind weniger weit aufgetrennt.

Im Gegensatz zu c-Fos wird die TPA abhängige Modifikation des c-Jun durch die Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase vollständig revertiert (Abb. 6: anti Jun). Das ebenfalls phosphorylierte c-Jun aus Kontrollzellen und das c-Jun aus TPA induzierten Zellen zeigen nach der Hydrolyse das gleiche Laufverhalten im SDS-AA-Gel.

Aufgrund der gezeigten Versuche ist deutlich geworden, daß die Modifikationen am c-Fos und am c-Jun nach TPA-Behandlung der Zellen unterschiedlich sind. Während die Modifikation von c-Jun wahrscheinlich vollständig auf Phosphorylierung beruht, erfährt c-Fos neben der Phosphorylierung noch eine andere Modifikation.

1.6. Auch UV-Strahlung führt zu einer schnellen Modifikation von c-Fos und c-Jun

Genau wie TPA führt auch UV-Bestrahlung von Zellen zu einer Proteinneusynthese unabhängigen Induktion des Kollagenasegens (Büscher et al., 1988; Krämer et al., 1990; Stein et al., 1991). Die Induktion wird ebenfalls über das TRE und den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt (Stein et al., 1991). Die Signalkette ist jedoch bei beiden Induktoren ganz verschieden. TPA dringt in die Zellmembran ein und aktiviert die Protein Kinase C, während der primäre Auslöser der UV-Antwort in der Zelle die Schädigung der DNA ist. Der weitere Verlauf der Signalketten ist noch weitgehend unbekannt (siehe Einleitung). Da aber sowohl TPA-Behandlung als auch UV-Bestrahlung schließlich zu einer AP-1 abhängigen Induktion des Kollagenase-Gen führen, wäre es möglich, daß die beiden Signalketten vor AP-1 konvergieren und so zu den gleichen Modifikationen an AP-1 führen.

Es zeigte sich jedoch, daß die UV-Bestrahlung von Zellen nur zu einer sehr geringen, transienten Veränderung des Laufverhalten von c-Fos im SDS-AA-Gel führt (Abb. 1a: UV und Abb. 5: anti Fos UV (³⁵S)). C-Jun dagegen wird nach UV-Bestrahlung der Zellen in zwei unterschiedliche Modifikationsformen überführt (Abb. 1b: UV und Abb. 5: anti Jun UV (³⁵S)). Eine Form zeigt ein etwas langsames Laufverhalten als das c-Jun aus unbehandelten Zellen, ähnlich wie c-Jun nach Behandlung von Zellen mit TPA (Abb. 5: anti Jun (³⁵S)). Die zweite Form läuft im SDS-AA-Gel ungefähr um 4 kD höher (Abb. 1b: UV, durch Pfeil angezeigt). Da Neusynthese von Proteinen aufgrund der kurzen Induktionszeit ausgeschlossen ist und der Antikörper 891 außerdem keine Kreuzreaktion zu anderen Proteinen der Jun Familie aufweist, sollte es sich bei beiden Proteinen um c-Jun handeln. Abbildung 1 zeigt außerdem, daß die Modifikationen 15 Minuten nach UV-Bestrahlung der Zellen abgeschlossen sind und über 45 Minuten stabil bleiben (Abb. 1b: UV)

Wie zuvor nach TPA-Behandlung von Zellen findet auch nach UV-Bestrahlung eine offensichtlich unterschiedliche Modifikation von c-Fos und c-Jun statt. Zur näheren Charakterisierung der Modifikationen an c-Fos und c-Jun nach UV-Bestrahlung von Zellen wurden ebenfalls Dephosphorylierungs-Experimente gemacht. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter 1.5. beschrieben. Die Zellen wurden 15 Minuten nach UV-Bestrahlung geerntet.

C-Fos Protein aus UV-bestrahlten Zellen zeigt auch nach Dephosphorylierung keinen Unterschied zu c-Fos aus unbehandelten Zellen (Abb. 6: anti Fos: Ko und UV). Dies

bedeutet, daß C-Fos auch unter diesen Versuchsbedingungen keine nachweisbare Modifikation durch UV-Bestrahlung von Zellen erfährt. Die beiden nach UV-Bestrahlung von Zellen vorliegenden c-Jun Spezies verhalten sich unterschiedlich gegenüber Dephosphorylierung. Die 'leichtere' Form wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert und zeigt anschließend das gleiche Laufverhalten wie dephosphoryliertes c-Jun aus unbehandelten Zellen (Abb. 6: anti Jun, unterer Pfeil). Die durch UV-Bestrahlung von Zellen induzierten Modifikationen der 'schwereren' c-Jun Spezies werden nur teilweise durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase revidiert. Zwar zeigt das Protein eine etwas schnellere Laufverhalten nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase, der große Unterschied im Laufverhalten zu c-Jun aus Kontrollzellen bleibt jedoch erhalten (Abb. 6: anti Jun oberer Pfeil).

Es bieten sich wiederum die gleichen Erklärungsmöglichkeiten wie bei der TPA-induzierten Modifikation von c-Fos an. Möglicherweise besteht neben der Phosphorylierung eine zusätzliche Modifikation, oder die Modifikation hat zu einer Konformationsänderung geführt, die die Abspaltung von Phosphaten durch die alkalische Phosphatase behindert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß UV-Bestrahlung von Zellen zu anderen Modifikationen an den AP-1 Proteinen führt wie TPA. Während c-Fos möglicherweise überhaupt nicht modifiziert wird, wird c-Jun Protein in zwei unterschiedlich modifizierte Formen überführt. Nach TPA-Behandlung von Zellen sind dagegen die Modifikationen am c-Fos offensichtlicher.

2. Analyse der Modifikationen

Die Erfassung der Modifikationen von c-Fos und c-Jun nach Behandlung der Zellen mit TPA oder UV-Strahlung hat gezeigt, daß die schnelle Antwort der Zelle auf die veränderten Umwelteinflüsse über Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun läuft. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Lokalisation der Modifikationen im Protein untersucht. Die Identifizierung der Modifikationsstellen ermöglicht eine genaue Analyse der Funktion der einzelnen Modifikationen, erlaubt Rückschlüsse auf die beteiligten Enzyme und führt zu einem besseren Verständnis der durch TPA-Behandlung und UV-Strahlung induzierten Signalketten.

Die im folgenden Teil beschriebene Analyse der Modifikationen erfolgte durch Peptid-Kartierung (Scheidtman et al., 1982; Boyle et al., 1991b). Hierbei werden die Proteine durch eine Protease in spezifische Peptide zerlegt. Diese können nach 2-dimensionaler Auftrennung auf DC-Platten analysiert werden. Zur Erfassung der Unterschiede im Phosphorylierungszustand zwischen den Proteinen aus unterschiedlich behandelten Zellen wurden die Proteine mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Um die schnellen Modifikationen zu erfassen, wurde wiederum das konstitutiv exprimierte Protein markiert. Hierzu wurden die Zellen nach 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium 2.5 Stunden mit ^{32}P -Orthophosphat vorinkubiert und anschließend für 15 Minuten induziert. C-Fos und c-Jun wurden mit den spezifischen Antikörpern aus den Zellysaten immunpräzipitiert, auf einem SDS-AA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine konnten im Autoradiogramm identifiziert werden. Die Proteinbanden wurden aus der Nitrozellulose ausgeschnitten, verdaut, lyophilisiert, oxidiert, nochmals lyophilisiert, schließlich auf DC-Platten aufgetragen und mittels Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Die DC-Platten wurden anschließend autoradiographiert. Die Analyse des Autoradiogramms gab Auskunft darüber, ob und wie stark bestimmte Peptide phosphoryliert waren.

2.1. Tryptische Peptide von endogenem c-Jun Protein

Der Verdau von c-Jun erfolgte mit Trypsin. Trypsin spaltet Proteine in spezifische Peptide, wobei es hinter den Aminosäuren Lysin oder Arginin schneidet. Die Auftrennung der Peptide in der Elektrophorese erfolgte bei pH 1.9. Bei diesem pH-Wert tragen die meisten Peptide eine positive Ladung und laufen in der Elektrophorese zur Kathode. Die Chromatographie trennt die Peptide anschließend nach Hydrophobizität auf.

Ein Problem bei der Untersuchung von konstitutiven, endogenen Proteinen war, daß in diesen Fällen nur sehr wenig markiertes Protein für die aufwendige Analyse zur Verfügung stand.

In den Versuchen zu Abbildung 7, 8, und 9 wurden HeLa Zellen gemäß dem zuvor beschriebenen Schema mit ^{32}P Orthophosphat vormarkiert, anschließend mit TPA behandelt oder mit UV bestrahlt und nach 15 Minuten geerntet. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die weitere Aufarbeitung der Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben. Im oberen Teil der Abbildung 7 ist das Autoradiogramm der Nitrozellulose-Membran zu sehen. C-Jun ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Ebenso sind die beiden unterschiedlich modifizierten c-Jun Proteine aus UV-bestrahlten Zellen mit 1 und 2 markiert. Die einzelnen Proteine wurden aus der Nitrozellulose ausgeschnitten und verdaut. Im unteren Teil von Abbildung 7 sind die Autoradiogramme der DC-Platten mit den Phosphorylierungs-Mustern der Proteine zu sehen.

2.1.1. Analyse der Peptidmuster von c-Jun aus unbehandelten und TPA-behandelten Zellen

C-Jun aus unbehandelten Zellen zeigt vier verschiedene radioaktiv markierte Peptide *a*, *b*, *c*, *x* (Abb. 7: Kontrolle). Die Bezeichnung ist aus dem Schema in Abb. 8 zu entnehmen. Das Peptidmuster von c-Jun aus Zellen, die mit TPA induziert wurden, unterscheidet sich in zwei Einzelheiten von dem Muster des c-Jun's aus Kontrollzellen (Abb.7):

(1) Das Peptid *a* ist im Peptidmuster des c-Jun Protein aus TPA-behandelten Zellen nicht mehr sichtbar. Dies bedeutet, daß eine Dephosphorylierung am Peptid *a* stattgefunden hat, welche möglicherweise die Markierung eines Peptids vollständig beseitigt hat. Falls das Peptid *a* jedoch an mehreren Stellen phosphoryliert ist, könnte sowohl eine Dephosphorylierung, wie auch eine Phosphorylierung zu einem veränderten Laufverhalten in der 2-dimensionalen Auftrennung führen. Jede zusätzliche Phosphorylierung verändert einerseits die Ladung, d.h. das Peptid wird saurer und läuft langsamer zur Kathode, andererseits wird das Peptid hydrophiler und läuft langsamer in der Chromatographie. Dies führt zu einer diagonalen Anordnung der unterschiedlich stark phosphorylierten Peptide. Diese werden als 'Phospho-Isomere' bezeichnet. In Abb. 7 ist eine solche Anordnung für die Peptide *a*, *b* und *c* zu sehen. Wahrscheinlich handelt es sich bei *a*, *b* und *c* um 'Phospho-Isomere'. Folglich würde die TPA-Induktion zur Dephosphorylierung einer Phosphorylierungsstelle im Peptid führen. In dem Peptidmuster sind daher nur noch ein- und zweifach phosphorylierte Spezies sichtbar.

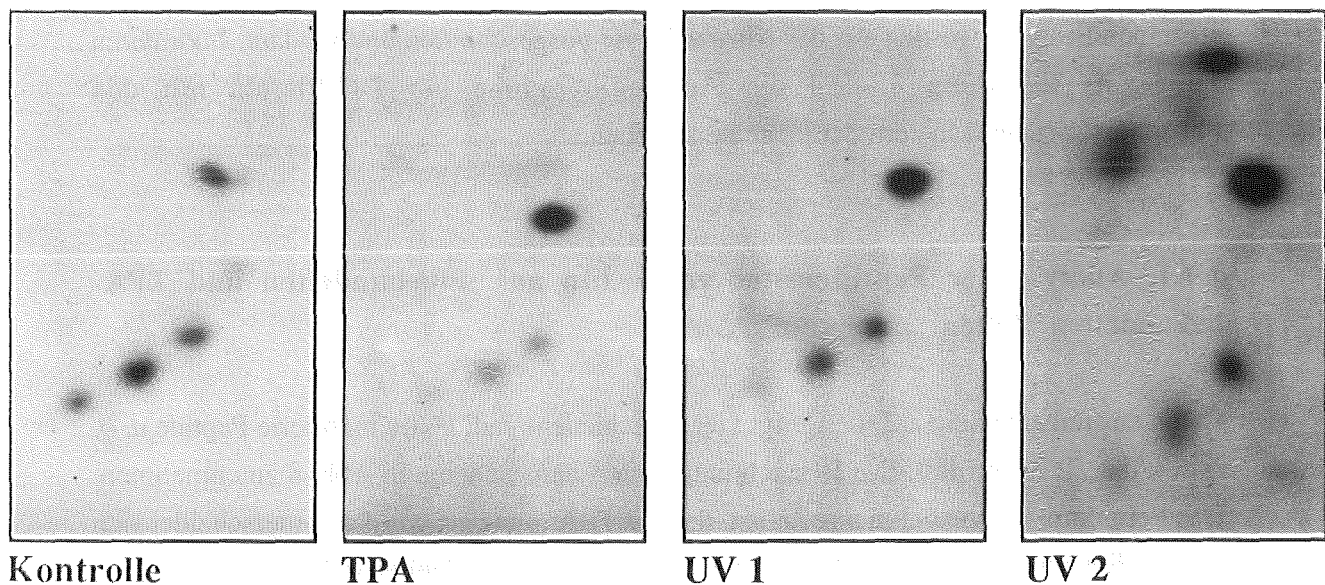
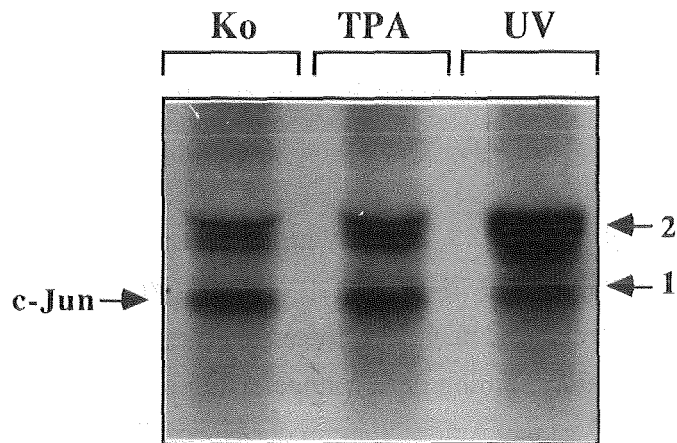


Abb. 7: Die Peptid-Analyse des endogenen c-Jun Proteins aus unbehandelten, mit TPA behandelten und UV-bestrahlten Zellen zeigt ein unterschiedliches Phosphorylierungs-Muster. Pro Punkt wurden zwei Petrischalen mit je 9×10^5 Hela tk Zellen angesetzt. Nach Inkubation der Zellen (24 h mit 8% FCS, danach 24 h mit 0.5% FCS) wurden diese 1.5 Stunden mit phosphatfreiem Medium inkubiert und anschließend für 2.5 Stunden mit ^{32}P Orthophosphat (18.5 MBq pro ml Medium) versetzt. Danach wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt oder UV bestrahlt (30J/m^2) oder nicht induziert (Kontrolle). Nach 20 min wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden mit den spezifischen Antikörpern, anti c-Fos X4B und anti c-Jun 891, aus den RIPA-Extrakten immunpräzipitiert. Die weitere Aufarbeitung bis zum SDS-AA-Gel erfolgte wie in Abb. 2 beschrieben. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Diese wurde anschließend autoradiographiert. Die mit Hilfe des Autoradiogramms identifizierten spezifischen Proteine wurden herausgeschnitten und an der Nitrozellulosemembran mit $2 \times 5 \mu\text{g}$ Trypsin in $50 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ verdaut. Die daraus resultierenden Peptide wurden aufgearbeitet und schließlich in $4 \mu\text{l}$ Elektrophorese-Puffer pH 1.9 aufgenommen. $3.5 \mu\text{l}$ wurden anschließend auf eine Zellulose-beschichtete Dünnschicht-Chromatographie-Platte (DC-Platte) aufgetragen ($\approx 200 \text{ cpm}$ pro Punkt). Die Auftrennung der Peptide in der Elektrophorese erfolgte bei 1000V für 25 min. Die Platten wurden anschließend luftgetrocknet und danach für 4.5 h chromatographiert. Die Expositionsdauer der DC-Platten betrug 14 Tage. Im oberen Teil der Abbildung ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Die Pfeile 1 und 2 zeigen die Banden, die herausgeschnitten und verdaut wurden. Das endogene c-Jun aus Kontrollzellen ist ebenfalls mit einem Pfeil angezeigt. Im unteren Teil sind die Peptidmuster der herausgeschnittenen Protein-Banden zu sehen.

(2) Das Peptid x wird in TPA-behandelten Zellen verstärkt phosphoryliert. Da Peptid x schon in den unbehandelten Zellen phosphoryliert ist, hätte eine zusätzliche Phosphorylierung an einer anderen Stelle im Peptid eine Veränderung des Laufverhaltens zur Folge. Mischexperimente, in denen tryptisch verdautes c-Jun aus Kontrollzellen und TPA-behandelten Zellen gemischt und auf der gleichen DC Platte aufgetrennt wurde, zeigten jedoch, daß das Peptid x in beiden Fällen die gleichen Laufeigenschaften besitzt (Daten für TPA nicht gezeigt, in Abb. 11b links unten: Kontrolle + UV3 zu sehen). Daraus folgt, daß das Peptid x in TPA-behandelten Zellen verstärkt phosphoryliert ist. Man könnte sich vorstellen, daß in den unbehandelten Zellen eine heterogene Mischung von unterschiedlich phosphoryliertem c-Jun vorliegt. Darunter sind auch, zu einem geringen Anteil, c-Jun Proteine am Peptid x phosphoryliert. Die Behandlung der Zellen mit TPA führt, über die Aktivierung spezifischer Kinasen, dazu, daß der Großteil des c-Jun Proteins am Peptid x phosphoryliert wird. Dies zeigt sich im Peptidmuster in einer verstärkten Phosphorylierung von x , ohne daß dadurch das Laufverhalten des Peptides beeinflußt wird. C-Jun aus unbehandelten Zellen, das am Peptid x phosphoryliert ist, ist möglicherweise für die basale AP-1 Aktivität in den Zellen verantwortlich (Angel et al., 1987a; Stein et al., 1989).

2.1.2. Analyse der Peptidmuster von c-Jun aus UV-bestrahlten Zellen

Die im oberen Teil von Abb. 7 mit 1 und 2 bezeichneten c-Jun Spezies, aus UV-bestrahlten Zellen zeigen ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster. Das Phosphorylierungsmuster des unteren c-Jun Proteins (UV 1) entspricht dem Muster von c-Jun aus TPA-behandelten Zellen, d.h.: Dephosphorylierung von a und Phosphorylierung von x im Gegensatz zu c-Jun aus unbehandelten Zellen. Das obere c-Jun Protein zeigt dagegen ein verändertes Phosphorylierungsmuster. Neben der in diesem Protein ebenfalls sichtbaren Dephosphorylierung von a und Phosphorylierung von x , hat das Protein noch zwei zusätzliche phosphorylierte Peptide (als u und v bezeichnet, siehe Schema Abb.8). Das phosphorylierte Peptid u ist teilweise auch in c-Jun aus TPA-behandelten Zellen und in 'unteren' c-Jun Spezies aus UV-bestrahlten Zellen (Abb.8: TPA 1 und UV 1; Abb.9: UV 1 und UV 2) vorhanden. Das phosphorylierte Peptid v dagegen findet man nur im c-Jun aus UV-bestrahlten Zellen, in der im höheren Molekulargewichtsbereich laufenden Spezies (Abb.8: UV 3+4; Abb.9: UV 3; UV 4). Die Proteine aus den unbehandelten und TPA-behandelten Zellen, die im ähnlichen Molekulargewichtsbereich laufen, haben ein völlig anderes Phosphorylierungsmuster (Abb.8: TPA 4; Abb.9: Kontrolle 4, TPA 4). In manchen Fällen war eine genaue Trennung dieser Proteine und der, nach UV-Induktion der Zellen im höheren Molekular-

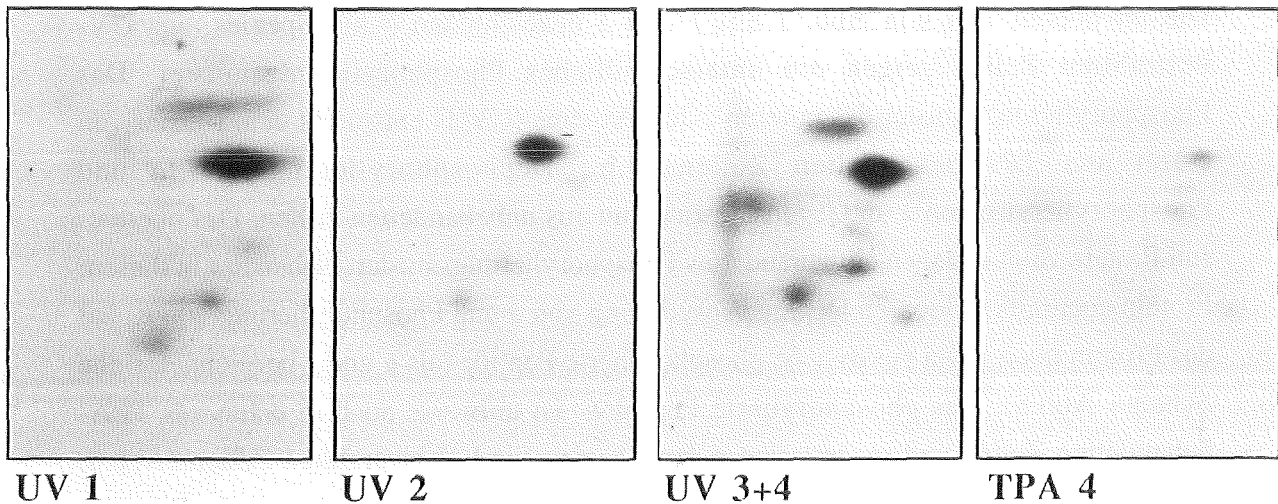
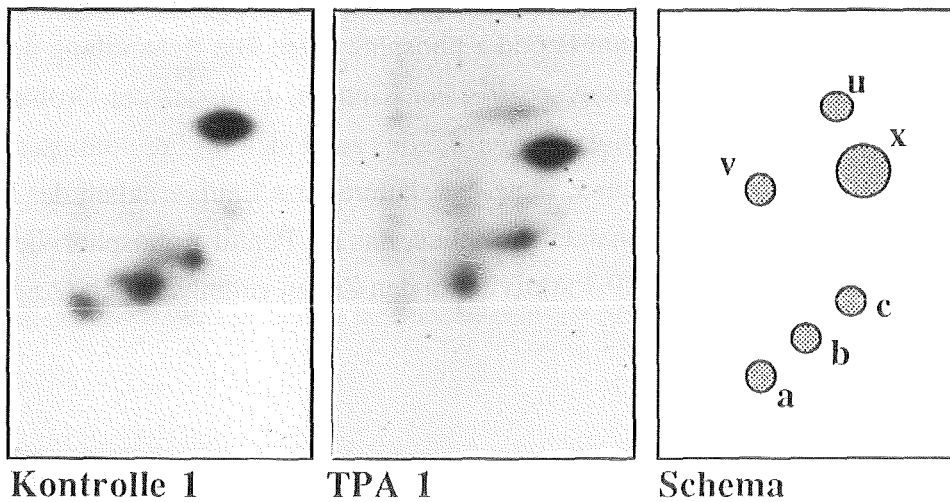
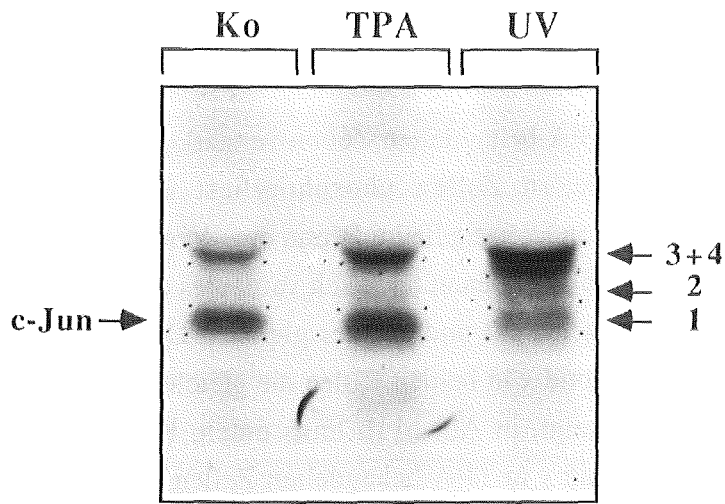


Abb. 8: Peptid-Analyse beweist die Spezifität der zusätzlichen c-Jun Spezies in UV-bestrahlten Zellen. Versuchsanordnung und Versuchsdurchführung entspricht der von Abb.8. Zusätzlich wurde das kopräzipitierte Protein aus den TPA-behandelten Zellen verdaut und verschiedene Jun Spezies aus UV-bestrahlten Zellen. Im oberen Drittel der Abbildung ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Die Pfeile 1, 2 und 3+4 bezeichnen die Banden, die herausgeschnitten und verdaut wurden. Der Pfeil c-Jun zeigt auf das endogene c-Jun aus Kontrollzellen. Im unteren Teil sind die Peptidmuster der einzelnen herausgeschnittenen Proteine zu sehen. Durchschnittlich wurden ~250 cpm auf die DC-Platte aufgebracht. Im Falle von TPA 4 und UV 2 waren es nur ~100. Die DC Platten wurden 14 Tage autoradiographiert. TPA 4 und UV 2 drei Wochen. Außerdem ist ein Schema des Peptidmusters des Fos Proteins zu sehen, wobei die einzelnen Peptide benannt sind.

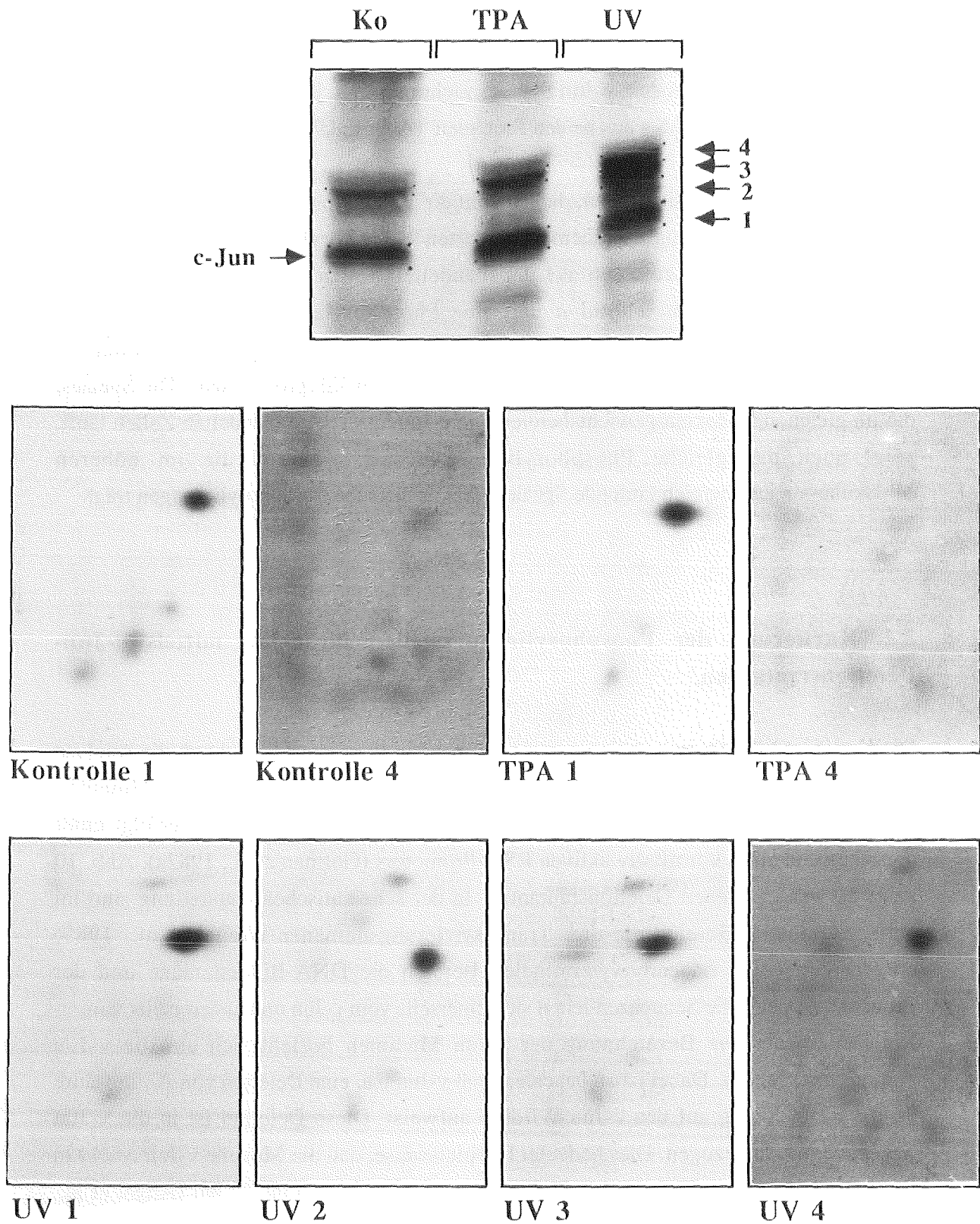


Abb. 9: Peptid-Analyse der verschiedenen c-Jun Spezies aus unbehandelten, TPA-behandelten und UV-bestrahlten Zellen. Versuchsdurchführung entspricht der von Abb.8. Es wurden lediglich noch zusätzliche Proteine verdaut. Im oberen Teil der Abbildung ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Die Pfeile 1, 2, 3 und 4 bezeichnen die Banden, die herausgeschnitten und verdaut wurden. Der Pfeil c-Jun zeigt auf das endogene c-Jun aus Kontrollzellen. Im unteren Teil sind die Peptidmuster der herausgeschnittenen Proteine zu sehen. Durchschnittlich wurden ~250 cpm auf die DC-Platte aufgebracht. Die DC-Platten wurden 14 Tage autoradiographiert. Die Proben Kontrolle 4, TPA 4 enthielten nur ~100 cpm. Diese DC Platten wurden 4 Wochen autoradiographiert.

gewichtsbereich auftretenden, c-Jun Species nicht möglich. Die Peptidmuster zeigen in diesen Fällen eine Mischung aus beiden Proteinen (Abb. 8: UV 3+4; Abb. 9: UV 4).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die Behandlung von Zellen mit TPA, als auch die UV-Bestrahlung zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster des c-Jun Proteins, im Vergleich zu c-Jun aus unbehandelten Zellen, führt. TPA bewirkt eine Dephosphorylierung am Peptid *a* und eine Phosphorylierung am Peptid *x*. UV-Bestrahlung von Zellen führt zu zwei c-Jun Spezies (das zusätzliche c-Jun Protein in Abbildung 8 und 9 (UV2) stellt wahrscheinlich ein Intermediärprodukt dar). Die Spezies, die im gleichen Molekulargewichtsbereich wie c-Jun aus TPA-behandelten Zellen läuft, zeigt auch das gleiche Phosphorylierungsmuster, während die im höheren Molekulargewichtsbereich laufende Spezies zwei zusätzliche Phosphorylierungen trägt.

2.2. Kartierung der Phosphorylierungsstellen im c-Jun mittels c-Jun-Deletionsmutanten.

Die Kartierung der Phosphorylierungsstellen im c-Jun Protein erfolgte durch die Analyse von Deletionsmutanten des c-Jun und v-Jun Proteins. Die verschiedenen Mutanten wurden von P. Angel zur Verfügung gestellt. Die Expression der Proteine erfolgt unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven RSV-Promotors (Gorman et al., 1982a). Abb. 10 zeigt die verschiedenen Deletionsmutanten. In der schematischen Darstellung sind im aminoterminalen Bereich die drei Transaktivierungsdomänen (Angel et al., 1989) eingezeichnet und im carboxyterminalen Bereich die DNA-Bindedomäne und der 'Leucine-Zipper'. Die Sequenzen leiten sich einerseits vom c-Jun und andererseits vom v-Jun Protein ab. Die Bezeichnung der v-Jun Mutanten bezieht sich auf die v-Jun Aminosäuresequenz. Dabei ist zu beachten, daß v-Jun u.a. eine Deletion von Aminosäure 34 bis 61 in Bezug auf den c-Jun Wildtyp aufweist. Diese Deletion ist in die v-Jun Schemata mit einbezogen. Dies bedeutet beispielsweise, daß die Mutante v-Jun Δ 6/44 in Bezug auf den c-Jun Wildtyp eine Deletion von Aminosäure 6 bis 72 hat (Angel et al., 1988a; 1989).

Aufgrund der sehr guten Transfektionseigenschaften wurden GM 637 Zellen (SV 40 transformierte menschliche Fibroblasten) für die Expressionsversuche benutzt. Diese ermöglichen die Analyse der Mutanten im transienten Versuch, ohne daß stabile Zellklone hergestellt werden mußten. Für die Peptid-Kartierung wurden GM637 Zellen mit den Plasmiden, welche die verschiedenen c-Jun und v-Jun Deletionsmutanten und das

Wildtyp Protein exprimierten, über Nacht transfiziert, danach für 24 Stunden mit 0.5% FCS inkubiert und anschließend, nach 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium, für 2.5 Stunden mit ^{32}P Orthophosphat inkubiert. 20 Minuten nach Induktion der Zellen durch TPA (nur mit c-Jun Wildtyp Protein) oder 20 Minuten nach UV-Bestrahlung wurden die Zellen, wie zuvor bei den Versuchen mit endogenen Proteinen aus HeLa Zellen, weiterbehandelt und die Proteine aufgearbeitet.

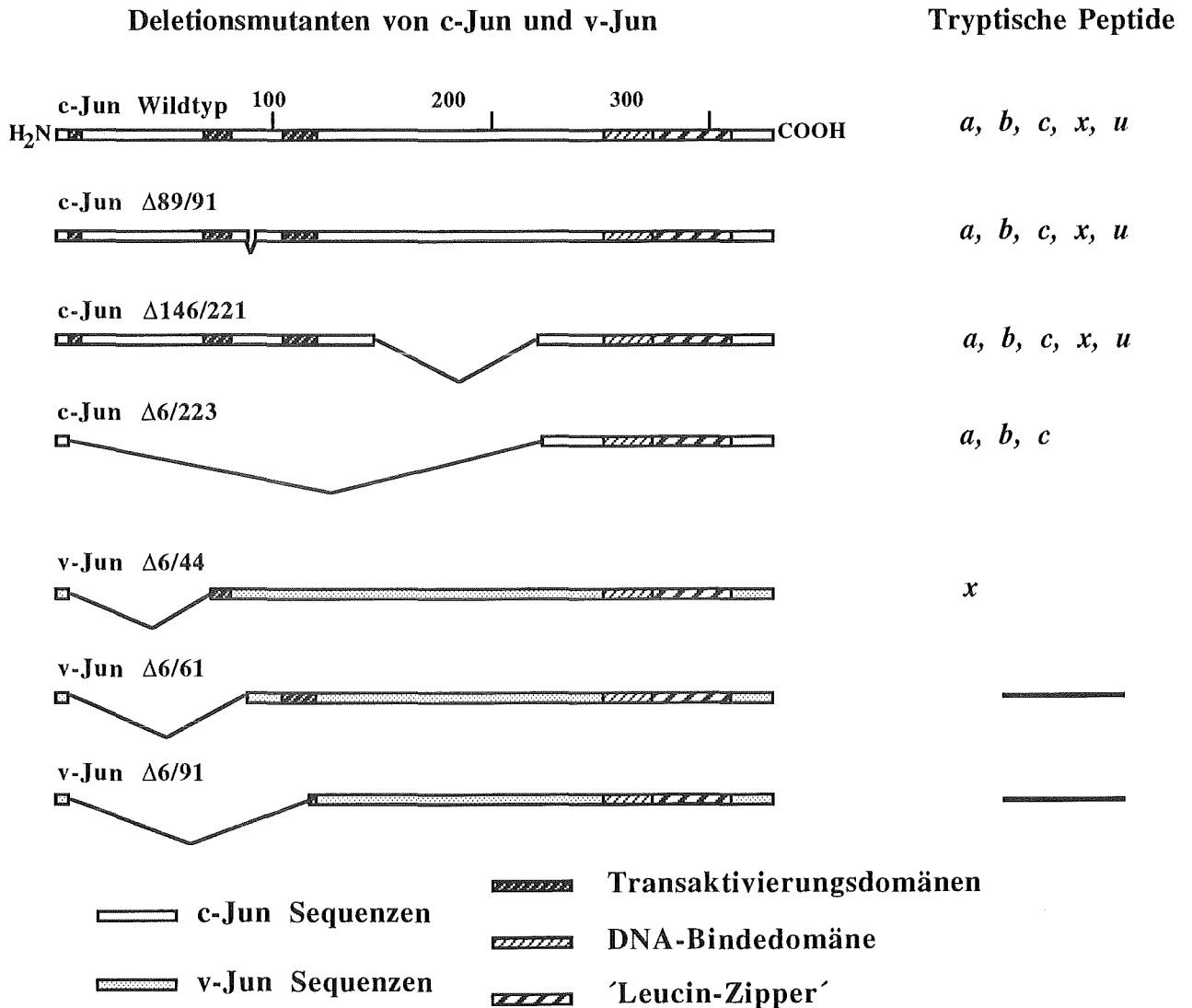


Abb. 10: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten von c-Jun und v-Jun (Angel et al., 1988a; 1989) und Tabelle über die, in den Mutanten enthaltenen, tryptischen Peptide. Die Kennzeichnung der verschiedenen Domänen der Proteine ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

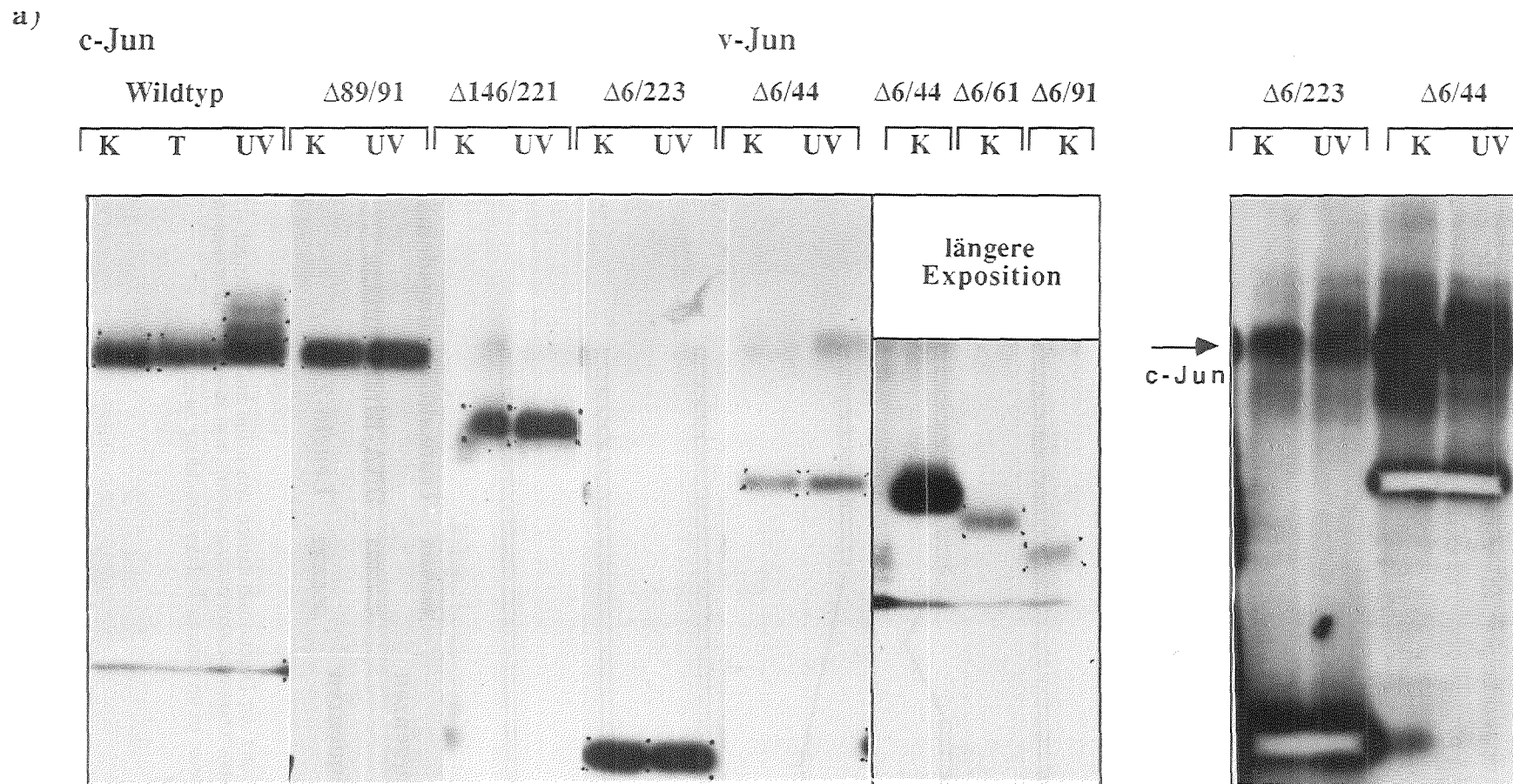
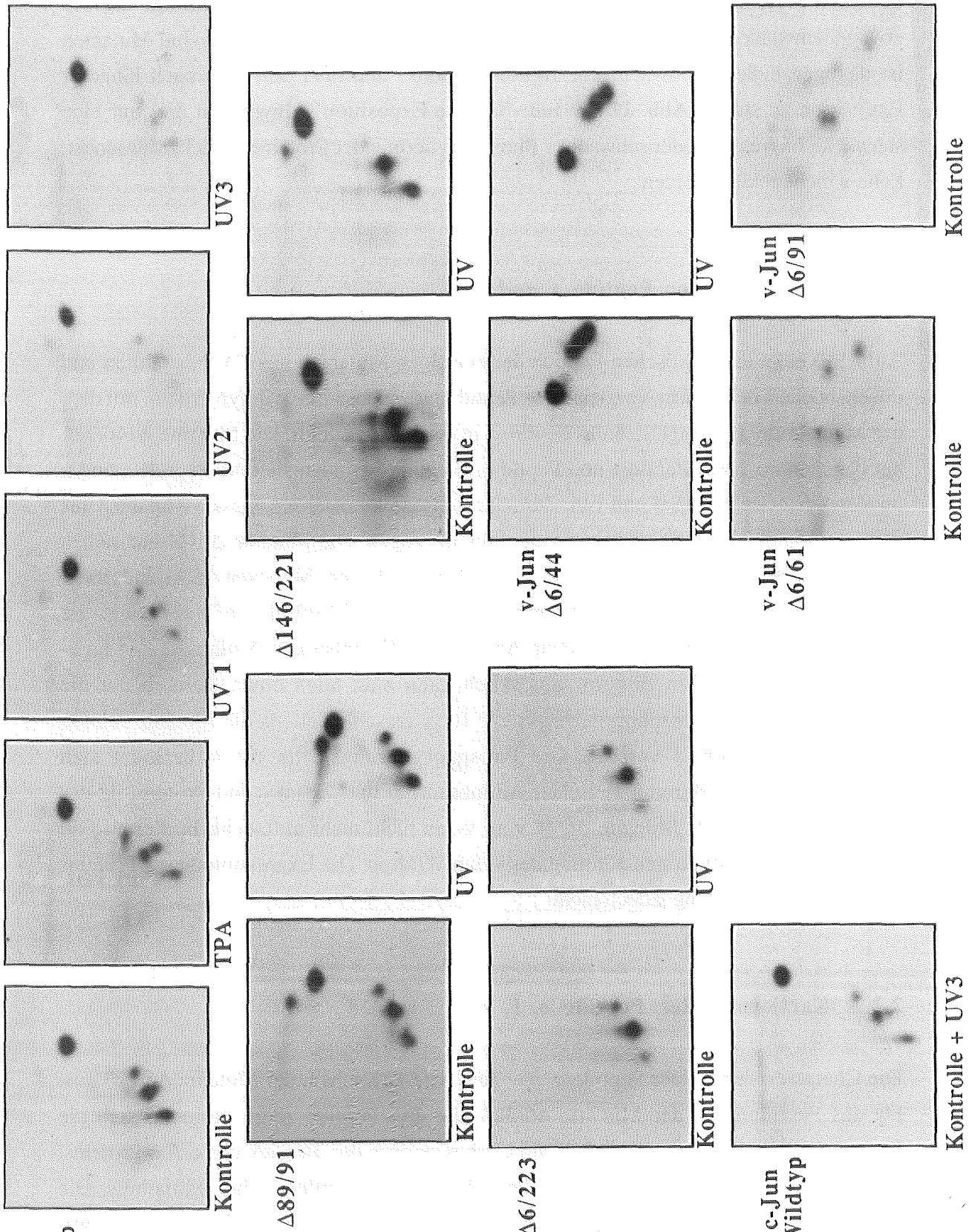


Abb. 11: Die Analyse von c-Jun Deletionsmutanten in der transienten Expression, ermöglicht die Kartierung der Phosphorylierungsstellen. 2.5×10^5 GM637 Zellen wurden über Nacht mit $4 \mu\text{g}$ der angegebenen RSV Expressionsvektoren transfiziert. Danach wurden sie für 24 h mit 0.5% FCS inkubiert. Zur Phosphat-Markierung der Proteine wurden die Zellen anschließend für 1.5 Stunden in phosphatfreiem Medium kultiviert und danach für 2.5 Stunden mit ^{32}P Orthophosphat ($18.5 \text{ MBq pro ml Medium}$) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit UV bestrahlt (30 J/m^2) bzw. nicht induziert (K). Zusätzlich wurde ein Ansatz (c-Jun Wildtyp) mit $80 \text{ ng TPA/ml Medium}$ behandelt. Nach 20 min wurden die Zellen geerntet. Aus den RIPA Extrakten wurden die verschiedenen Jun Proteine mit einem spezifischen Antikörper (anti Jun Ab-1) herauspräzipitiert und auf einem 10 %igen SDS-AA-Gel aufgetrennt. Die Weiterverarbeitung, sowie die Peptid Kartierung erfolgte wie bei Abb. 8. Teil a der Abb. 11 zeigt das Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters. Die herausgeschnittenen Bereiche sind mit Punkten auf dem Autoradiogramm markiert. Zur Detektion der v-Jun $\Delta 6/61$ und $6/91$ Mutanten mußte die Nitrozellulose-Membran 6 mal länger exponiert (12 Stunden) werden. Im rechten Teil ist eine noch längere Exposition (3 Tage) der c-Jun $\Delta 6/223$ und v-Jun $\Delta 6/44$ Mutanten zu sehen. Der Pfeil zeigt das endogene c-Jun Protein an. Die exogenen c-Jun $\Delta 6/223$ und v-Jun $\Delta 6/44$ Proteine sind bereits herausgeschnitten worden. Teil b zeigt die Peptid Auftrennung der einzelnen Proteinbanden aus Teil a. Die Expositionszeit betrug ein bis zwei Tage. Lediglich v-Jun $\Delta 6/61$ und $\Delta 6/91$ wurden 14 Tage autoradiographiert.

b)
c-Jun
Wildtyp



In Abb. 11a ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Es zeigt, daß die c-Jun Mutanten gleich stark durch Phosphat markiert sind und demzufolge auch in etwa gleich stark exprimiert werden. Die Markierung der verschiedenen v-Jun Mutanten ist dagegen äußerst schwach. Die Mutanten $\Delta 6/61$ und $6/91$ sind erst nach längerer Exposition zu sehen (Abb. 11a v-Jun: 'längere Exposition'). Inwieweit dies auf eine schwache Expression oder schwachen Phosphorylierung der Proteine zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.

2.2.1. Kartierung der Peptide *x* und *u*

Abb. 11b zeigt die tryptischen Peptide der einzelnen Mutanten aus UV-bestrahlten und unbehandelten Zellen. Ein Vergleich des Peptidmuster von c-Jun Wildtyp Protein mit dem der Mutante $\Delta 6/223$ zeigt, daß das Peptid *x* in der Mutante fehlt. Die Mutante $\Delta 146/221$ hat dagegen noch das Peptid *x* und Peptid *u*. Folglich befinden sich die Peptide *x* und *u* im Bereich zwischen AS 6 und 146. Zur näheren Charakterisierung wurden Mutanten aus dem aminoterminalen Bereich von v-Jun hinzugezogen. Die Mutante $\Delta 6/44$ hat, neben drei nicht identifizierbaren Peptiden noch das Peptid *x*. In den Mutanten $\Delta 6/61$ und $\Delta 6/91$ ist dagegen das Peptid *x* nicht mehr vorhanden. Folglich befindet sich die Phosphorylierungsstelle für *x* zwischen Aminosäure 72 (entspricht Aminosäure 44 im v-Jun) und 146 im c-Jun Protein. Zusätzlich kann man noch einen Bereich um die Aminosäure 90 als Phosphorylierungsstelle für *x* ausschließen, da die Mutante $\Delta 89/91$ noch über das Peptid verfügt. Die Phosphorylierungsstelle für *u* befindet sich möglicherweise im Bereich zwischen Aminosäure 6 und 72 im c-Jun Protein, da das Peptid *u* schon in der Mutante $\Delta 6/44$ vom v-Jun nicht mehr auftaucht. In diesem Fall fehlt jedoch zur endgültigen Klärung der v-Jun Wildtyp. Die Expression dieses Proteins in GM637 Zellen gelang jedoch nicht.

2.2.2. Kartierung der Peptide *a*, *b*, *c*.

Die Charakterisierung der Peptide *a*, *b*, *c* geht, wie zuvor, von der Mutante $\Delta 6/223$ aus. Da das Peptidmuster der Mutante $\Delta 6/223$ alle drei Peptide zeigt, befinden sich die Phosphorylierungsstellen für *a*, *b*, *c* im Carboxyterminalen Bereich des c-Jun Proteins. Bemerkenswerterweise fehlen die Peptide *a*, *b*, *c* in allen v-Jun Mutanten. Die Aminosäuresequenz von v-Jun hat jedoch im carboxyterminalen Bereich nur zwei Punktmutationen gegenüber c-Jun. Eine dieser beiden Mutationen betrifft eine mögliche Phosphorylierungsstelle. Das Serin an der Stelle 244 im c-Jun Proteins ist gegen ein

Phenylalanin im ν -Jun ausgetauscht. Folglich müßte dies eine Phosphorylierungsstelle von a , b , c im c-Jun sein. Die Phosphorylierung an der AS 244 müßte auch weitere Phosphorylierungen beeinflussen, da aufgrund der Punktmutation im ν -Jun nur eine Phosphorylierungsstelle fehlen dürfte, jedoch a , b und c in den ν -Jun Mutanten nicht nachweisbar sind. Wie schon zuvor erwähnt, liegen die Phosphorylierungsstellen für a , b , c möglicherweise auf dem gleichen Peptid. Dieses würde, falls AS 244 eine Phosphorylierungsstelle ist, von AS 226 bis zu AS 252 reichen. In diesem Bereich befinden sich tatsächlich noch mögliche andere Phosphorylierungsstellen.

2.2.3. Kartierung von Peptid ν

Für die Charakterisierung der zusätzlichen Modifikation nach UV-Bestrahlung der Zellen erwies sich der Einsatz der Mutanten in GM 637 Zellen als wenig hilfreich, da sich das für die UV Induktion charakteristische Peptid ν nicht nachweisen ließ. Das c-Jun Wildtyp Protein zeigt zwar die charakteristische Veränderung im Laufverhalten im SDS-AA-Gel nach UV-Bestrahlung der Zellen (Abb. 12a: c-Jun Wildtyp), jedoch zeigt auch das c-Jun Protein aus dem höhermolekularen Bereich (UV3) in der Peptid-Kartierung kein Peptid ν . Man erkennt zwar eine verstärkte Phosphorylierung von Peptid u durch UV bei den Mutanten 89/91 und 146/221 (Abb. 11b: $\Delta 89/91$ und $\Delta 146/221$). Die Mutanten zeigen jedoch genau wie $\Delta 6/223$ und die ν -Jun Mutanten keine Veränderung im Laufverhalten im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel nach UV-Bestrahlung der Zellen (Abb. 11a). Als interner Standard für die UV-Induktion diente dabei teilweise das endogene c-Jun Protein. In Abb. 11a (rechts) ist eine längere Exposition von $\Delta 6/223$ und $\Delta 6/44$ gezeigt. Dabei sieht man deutlich die Veränderung des Laufverhaltens des endogenen c-Jun Proteins (Pfeil) nach UV-Bestrahlung der Zellen.

Die durch UV-Bestrahlung und TPA-Behandlung von Zellen induzierte Dephosphorylierung von Peptid a ist weder in den Phosphorylierungsmustern des Wildtyp-Proteins noch bei denen der Mutanten sichtbar (Abb. 11b).

Durch die Analyse der Jun-Mutanten konnten die Phosphorylierungsstellen für die Peptide x und u in den Bereich zwischen Aminosäure 72 und 146 des c-Jun Proteins festgelegt werden. Die Phosphorylierungsstellen für a , b , c befinden sich wahrscheinlich zwischen Aminosäure 226 und 252, wobei eine Phosphorylierungsstelle am Serin 244 ist. Eine Kartierung des Peptids ν ist jedoch nicht gelungen.

2.3. Tryptische Peptide des endogenen c-Fos Proteins

Die Analyse des endogenen c-Fos Proteins erfolgte in der gleichen Weise, wie zuvor die Analyse des c-Jun. Im linken, oberen Teil der Abbildung 12 ist das Autoradiogramm der Nitrozellulose zu sehen. C-Fos aus TPA induzierten Zellen zeigt die charakteristische Veränderung im Laufverhalten, während c-Fos aus UV-bestrahlten Zellen keine sichtbare Veränderung in der 1-dimensionalen SDS-AA-Gelelektrophorese zeigt. Zur Peptid-Analyse wurden die mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine aus der Nitrozellulose herausgeschitten und wie in der Analyse des c-Jun aufgearbeitet (Kontroll-Spur: Protein 1 und 2; TPA-Spur: Protein 3; UV-Spur: Protein 1 und 2). Der Verdau erfolgte wiederum mit Trypsin.

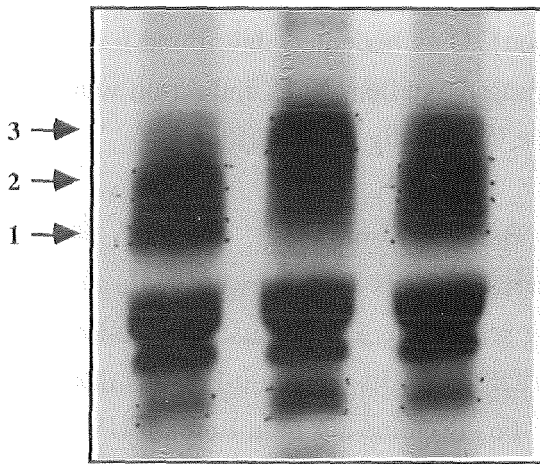
Im rechten, mittleren Teil von Abbildung 12 sind die Peptidmuster der einzelnen Proteine zu sehen. Die Identifikation von bestimmten Peptiden wurde sehr erschwert durch die Tatsache, daß ein Großteil der Peptide sehr schlecht aufgetrennt wurde. Bei sorgfältiger Analyse lassen sich drei Peptide identifizieren *a*, *b*, *c* (für die Benennung siehe Schemata: Ko 1 Trypsin). Ein Vergleich der Peptidmuster zwischen c-Fos aus Kontrollzellen und c-Fos aus TPA induzierten Zellen zeigt, daß die TPA-Behandlung der Zellen gleichzeitig zu einer Dephosphorylierung an Peptid *b*, *c* und Phosphorylierung an Peptid *a* führt. Bei Peptid *a* und *b* könnte es sich möglicherweise, aufgrund der diagonalen Anordnung um

Abb. 12: linker Teil: Peptid-Analyse des endogenen c-Fos zeigt unterschiedliche Modifikationen des c-Fos Proteins aus unbehandelten, mit TPA behandelten oder UV-bestrahlten Zellen. Die Versuchsdurchführung war exakt die gleiche wie bei Abb. 7. Aus den Überständen der Immunpräzipitation mit c-Jun Antikörpern wurden die c-Fos Proteine immunpräzipitiert (Anmerkung: Die umgekehrte Vorgehensweise führt zum gleichen Ergebnis). Die Auftrennung und Aufarbeitung der Proteine in der Peptid-Kartierung erfolgte ebenfalls wie bei Abb. 8. Im oberen Bereich der Abb.12a ist das Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters zu sehen. Die herausgeschnittenen Banden sind mit Pfeilen und Punkten auf dem Autoradiogramm markiert. Der untere Bereich zeigt das Peptidmuster der einzelnen Proteinbanden. Es wurden durchschnittlich 300 cpm auf die DC-Platten aufgebracht. Die Expositionszeit betrug 14 Tage.

rechter Teil: Exogenes c-Fos Protein aus GM637 Zellen zeigt nach Trypsin-Verdau das gleiche Phosphorylierungsmuster wie endogenes Protein aus HeLa Zellen. GM637 Zellen wurden wie bei Abb.11 beschrieben behandelt. Die Transfektion erfolgte mit 4 µg RSV c-Fos Wildtyp Expressionsplasmid und die Zellen wurden mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt. Im oberen Bereich der Abb.12b ist das Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters zu sehen. Die Expositionszeit betrug 1 Stunde gegenüber der 16 stündigen Exposition des Nitrozellulosefilters im linken Teil der Abbildung. Die herausgeschnittenen Banden sind mit Pfeilen und Punkten auf dem Autoradiogramm markiert. Die aus der Nitrozellulose herausgeschrittenen Proteinbanden Kontrolle 2 und TPA 2 wurden je zur Hälfte mit 2 x 5 µg Trypsin und mit 2 x 5 µg Chymotrypsin (in 50 mM NH₄HCO₃) verdaut. Die restlichen Banden wurden nur mit Chymotrypsin verdaut. Der untere Bereich zeigt die Peptidmuster der einzelnen Proteinbanden. Es wurden durchschnittlich 800 cpm auf die DC-Platten aufgebracht. Die Expositionszeit betrug 2 Tage. Im unteren Teil der Abbildung ist eine schematische Darstellung der Peptidmuster für Trypsin und Chymotrypsin mit Benennung der einzelnen Peptide zu sehen.

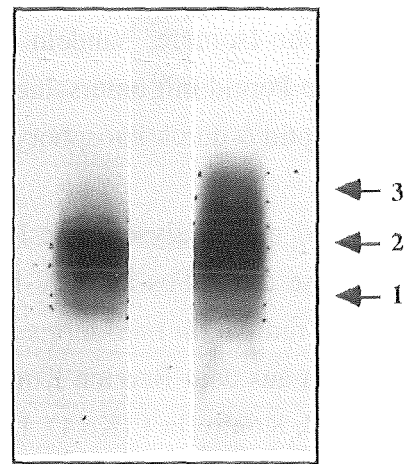
Hela tk⁻

Ko TPA UV

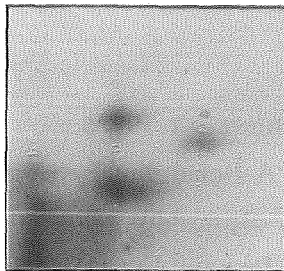


GM 637 RSV c-Fos

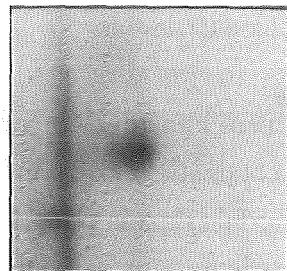
Ko TPA



Trypsin

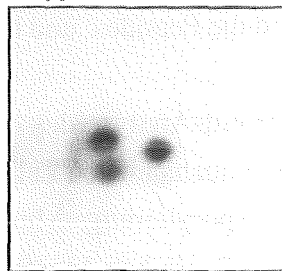


Ko 1

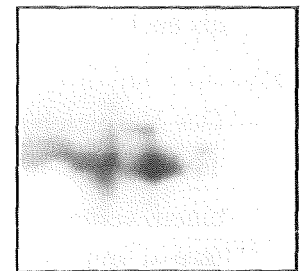


TPA 3

Trypsin

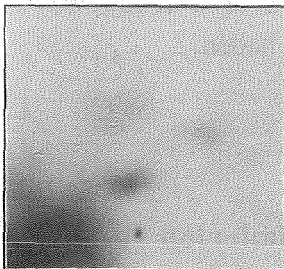


Ko 2

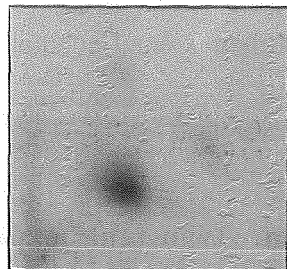


TPA 2

Trypsin

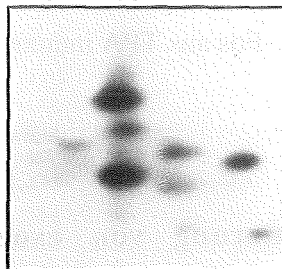


Ko 2

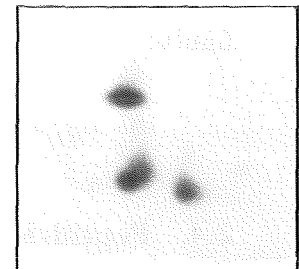


UV 1

Chymotrypsin



Ko 1



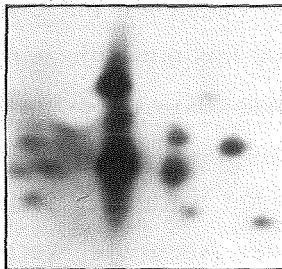
TPA 1

Trypsin

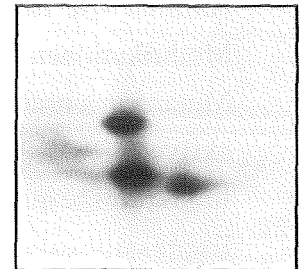


UV 2

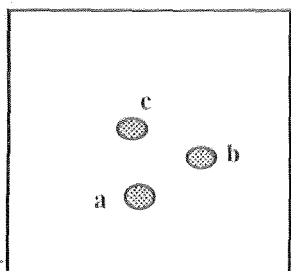
Chymotrypsin



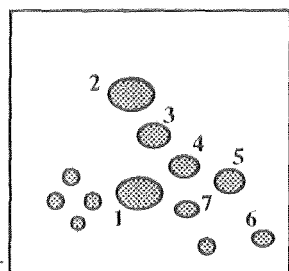
Ko 2



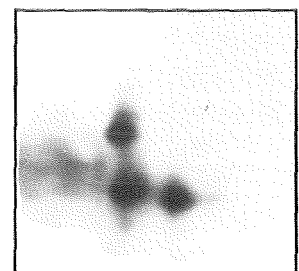
TPA 2



Schema Ko 1 Trypsin



Schema Ko 1 Chymotrypsin



TPA 3

‘Phospho-Isomere’ handeln (siehe Jun Modifikation). Dies bedeutet, daß *a* und *b* das gleiche Peptid mit unterschiedlicher Phosphorylierung darstellen. Nach Induktion wird das Peptid *b* durch Phosphorylierung möglicherweise vollständig in *a* überführt .

Sowohl die Analyse des c-Fos Proteins aus dem Bereich Kontrolle 2, wie auch die Analyse des c-Fos aus UV-bestrahlten Zellen erwies sich als sehr schwierig, da nur wenig radioaktiv markiertes Protein zur Verfügung stand. Das Peptidmuster des c-Fos Protein aus dem Bereich Kontrolle 2 (Ko 2) entspricht dem Muster von c-Fos aus dem Bereich Kontrolle 1 (Ko 1). Das Peptidmuster der c-Fos Proteine aus dem Bereich UV 1 und UV 2 entspricht dagegen eher dem Muster von c-Fos aus TPA-behandelten Zellen (TPA 3). Peptid *b* und *c* sind jedoch nicht vollständig dephosphoryliert. Sowohl bei UV 1 als auch bei UV 2 sind die Peptide *c* und *b* noch identifizierbar.

Der Vergleich der Peptid-Analyse des endogenen, konstitutiv exprimierten c-Fos aus TPA-behandelten und unbehandelten Zellen macht deutlich, daß die TPA-Behandlung zu einem veränderten Phosphorylierungs-Muster im c-Fos Protein führt. UV-Bestrahlung von Zellen führt zu einem ähnlichen Muster. Trotzdem zeigt das c-Fos Protein aus UV-bestrahlten Zellen kein verändertes Laufverhalten im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel (Abb.12 rechts, oberer Teil). Dies zeigt, daß Phosphorylierungen bei der Änderung des Laufverhaltens von c-Fos aus TPA induzierten Zellen keine Bedeutung haben.

2.4. Peptid-Kartierung von exogenem, transient exprimierten c-Fos Protein

Ähnlich wie in den Versuchen mit c-Jun Protein erfolgte die weitere Analyse der Modifikationen von c-Fos mit Hilfe von Deletionsmutanten. Die verschiedenen c-Fos Mutanten wurden, wie zuvor die c-Jun Mutanten, unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven RSV-Promotors in GM 637 Zellen exprimiert. Die Transfektions- und Induktionsbedingungen waren die gleichen wie bei den Transfektionen der c-Jun Expressionsplasmide. Auch die Aufarbeitung der Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben.

2.4.1. Peptid-Kartierung des transient exprimierten c-Fos Wildtyp Proteins mit verschiedenen Proteasen.

Aufgrund der starken Expression der transient exprimierten Proteine in GM 637 Zellen stand viel mehr Protein zur Verfügung als in den Versuchen mit den endogenen c-Fos Protein. Daher konnten die Versuchsbedingungen variiert werden (d.h.: Verdau mit verschiedenen Enzymen, Elektrophorese und Chromatographie mit verschiedenen Puffern). Im Versuch zur Abbildung 12 (rechte Hälfte) wurden GM637 Zellen mit einem c-Fos Wildtyp Expressionsvektor (RSV c-Fos) transfiziert. Die weitere Durchführung erfolgte wie in den Versuchen mit transient transfizierten c-Jun Expressionsvektoren. Im rechten, oberen Teil der Abbildung 12 ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Dabei ist anzumerken, daß die Expositionsdauer dieses Autoradiogramms eine Stunde betrug, während im linken Teil der Abbildung 12 (endogenes c-Fos Protein aus HeLa Zellen) eine 16 stündige Exposition nötig war. Zusätzlich stammt das endogene Protein aus der 6-fachen Zellzahl. Dies macht die Mengenunterschiede zwischen endogenem und exogenem Protein deutlich.

Das c-Fos Protein aus den mit TPA behandelten Zellen zeigt in der 1-dimensionalen Auftrennung die charakteristische Veränderung des Laufverhalten. Das Protein wird jedoch nicht vollständig in die im höheren Molekulargewichtsbereich laufende Form überführt (Abb. 12; rechter oberer Bereich). Die aus der Nitrozellulose ausgeschnittenen Bereiche sind durch Pfeile markiert. Die aus dem Bereich 2 ausgeschnittenen Nitrozellulosestücke wurden nochmals geteilt und die Proteine mit Trypsin oder Chymotrypsin verdaut. Die übrigen Proben wurden mit Chymotrypsin verdaut. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Peptidmuster der mit Trypsin verdauten Proteine zeigen, daß das transient exprimierte c-Fos die gleiche Modifikation nach TPA-Behandlung der Zellen erfährt, wie das endogene Protein (vergleiche Abb. 12 rechte Hälfte: Trypsin Ko 2; TPA 2 und linke Hälfte: Trypsin Ko 1; TPA 3). Das Peptidmuster von c-Fos aus unbehandelten Zellen zeigt die drei Peptide *a*, *b* und *c*. TPA-Behandlung von Zellen führt zu einer Dephosphorylierung von Peptid *b* und *c*, und zu einer Phosphorylierung von Peptid *a*. Es ist daher möglich, die transient exprimierten Proteine zur Analyse der Modifikationsstellen zu benutzen.

Chymotrypsin spaltet Proteine präferentiell hinter den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan. Es zeigte sich, daß der Verdau der Proteine mit Chymotrypsin, verglichen mit Trypsin, zu besser verwertbaren und reproduzierbaren

Ergebnissen führt. Das Peptidmuster von c-Fos aus unbehandelten Zellen zeigt eine große Zahl unterschiedlich stark phosphorylierter Peptide (Abb.12 rechte Seite: Chymotrypsin Ko 1). Im unteren Teil der Abbildung 12 ist ein Schema des Peptidmusters mit Benennung der Peptide zu sehen (Schema Ko 1 Chymotrypsin). Im C-Fos Protein aus TPA-behandelten Zellen sind nur noch die Peptide 1, 2 und 7 zu identifizieren (Abb 12 rechte Seite: TPA 1, TPA 2, TPA 3). Die Peptide 7 und 2 sind verstärkt phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung von Peptid 2 in Abbildung 16 besser zu sehen ist. Die Peptide 3, 4, 5 und 6 werden dephosphoryliert. Die Peptide 4 und 5 könnten aufgrund der diagonalen Anordnung einfach phosphorylierte 'Phospho-Isomere' von Peptid 1 und 7 darstellen, die nach Phosphorylierung mit dem Peptid 1 und 7 laufen.

Die unbehandelten Zellen enthalten wahrscheinlich eine sehr heterogene Mischung von unterschiedlich stark phosphorylierten c-Fos Proteinen, die durch TPA-Induktion in eine genau definierte Form überführt werden.

Das Phosphorylierungs-Muster von c-Fos aus TPA-behandelten Zellen ist, unabhängig aus welchem Molekulargewichtsbereich das Protein stammt, identisch (Abb. 12 rechte Seite: vergleiche TPA 1, TPA 2 und TPA 3). Ebenso zeigt das aus unbehandelten Zellen stammende c-Fos Protein, unabhängig vom Molekulargewichtsbereich, das gleiche Phosphorylierungs-Muster (Abb. 12 rechte Seite: vergleiche Ko 1 und Ko 2). Dies macht nochmals deutlich, daß für die starke Veränderung im Laufverhalten von c-Fos nach TPA-Behandlung der Zellen eine andere Modifikation als Phosphorylierung verantwortlich ist.

2.4.2. Peptid-Kartierung des transient exprimierten c-Fos Wildtyp Proteins nach UV-Bestrahlung der Zellen

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse, wonach c-Fos Proteine, die im gleichen Molekulargewichtsbereich im SDS-AA-Gel laufen, verschieden modifiziert sein können, stellte sich die Frage, ob UV-Bestrahlung nicht doch zu einer Modifikation von c-Fos führt, obwohl im SDS-AA-Gel kein Laufunterschied sichtbar wurde (Abb. 1 und Abb. 12). Zu diesem Zweck wurden GM637 Zellen wie unter 2.4.1. beschrieben mit einem c-Fos Expressionsvektor transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben. Die Zellen wurden mit UV-bestrahlt und 20 Minuten später geerntet. Der Verdau der Proteine erfolgte mit Chymotrypsin.

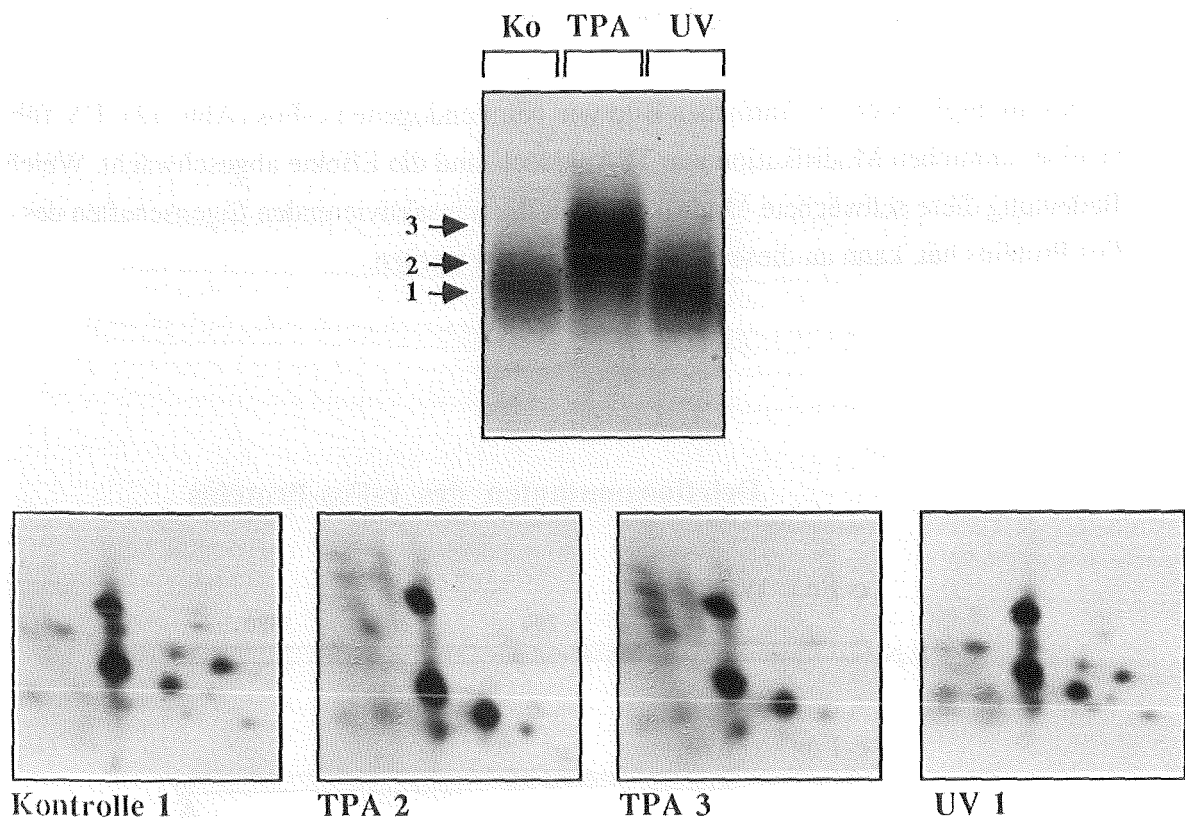


Abb. 13: Unterschiedliches Peptidmuster von exogenem c-Fos Protein aus TPA-behandelten oder UV-bestrahlten Zellen. 2.5×10^5 GM637 Zellen wurden mit jeweils $4 \mu\text{g}$ RSV c-Fos Expressionsvektor transfiziert. Die Weiterbehandlung der Zellen erfolgte wie bei Abb. 10 beschrieben. Nach der Inkubation mit ^{32}P Orthophosphat wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt oder UV-bestrahlt (30 J/m^2) oder nicht induziert. Nach 20 min wurden die Zellen geerntet. Aus den RIPA-Extrakten wurde das Fos Protein mit einem spezifischen Antikörper (anti Fos X4B) präzipitiert und auf einem 10 %igen SDS-AA-Gel aufgetrennt. Die Weiterverarbeitung, sowie die Peptid-Kartierung erfolgte wie bei Abb. 8 beschrieben. Der Verdau der Proteine wurde mit $2 \times 5 \mu\text{g}$ Chymotrypsin durchgeführt. Der obere Teil der Abb. 14 zeigt das Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters. Die herausgeschnittenen Bereiche sind durch Pfeile und Punkte markiert. Der untere Bereich zeigt die Peptidmuster der Proteine. Es wurden durchschnittlich 800 cpm auf die DC-Platten aufgebracht. Die Expositionszeit der DC-Platten betrug 48 Stunden. Ko: Kontrolle.

Im oberen Teil der Abbildung 13 ist das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran zu sehen. Man erkennt das veränderte Laufverhalten von c-Fos nach TPA-Induktion der Zellen. C-Fos aus UV-bestrahlten Zellen zeigt dagegen keine Modifikation im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel. Ein Vergleich der Phosphorylierungs-Muster von c-Fos aus unbehandelten und TPA-behandelten Zellen zeigt die im Kapitel 2.4.1. beschriebenen Unterschiede (Phosphorylierung von Peptid 2 und 7; Dephosphorylierung von Peptid 3, 4, 6). C-Fos aus UV-bestrahlten Zellen zeigt ein Phosphorylierungs-Muster, das in der Tendenz dem Muster von c-Fos aus TPA-induzierten Zellen (Dephosphorylierung von Peptid 5 und Phosphorylierung von Peptid 2 und 7; Abb.13: UV 1) ähnelt. Allerdings ist

im Falle von UV die Änderung der Modifikation nicht so prägnant wie nach TPA. So bleiben die Peptide 3, 4 und 7 auch nach UV-Induktion noch nachweisbar.

Insgesamt ergibt sich ein ähnliches Bild wie beim endogenen c-Fos (Abb. 12). UV führt zu einer ähnlichen Modifikation wie TPA, jedoch sind die Effekte abgeschwächt. Welche Bedeutung diese schwächere Modifikation für die transaktivierenden Eigenschaften des c-Fos Proteins hat, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Deletionsmutanten des c-Fos-Proteins

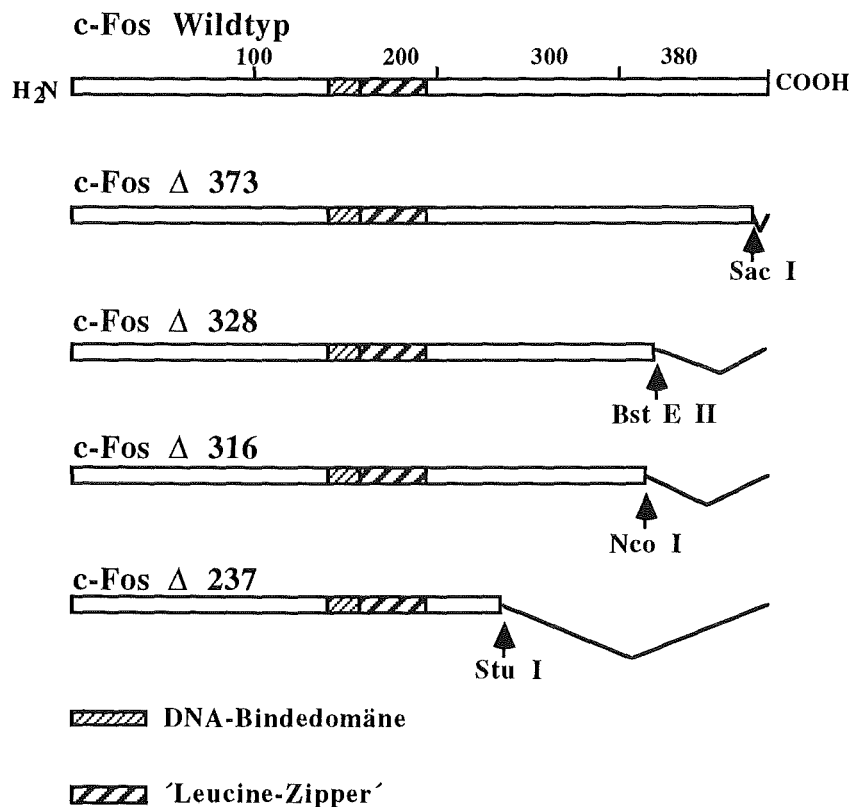


Abb. 14: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten des c-Fos Proteins. Mit Hilfe der angegebenen Restriktionsenzyme und einer Schittstelle für XhoI im 3' Bereich hinter den c-Fos Sequenzen wurden die Sequenzen aus c-Fos Wildtyp herausdeletiert. Außerdem sind die Bereiche der DNA-Bindedomäne und des 'Leucine-Zippers' gekennzeichnet.

2.5. Kartierung der Phosphorylierungsstellen im c-Fos Protein mittels Deletionsmutanten.

Der größte Teil der beschriebenen transaktivierenden und transreprimierenden Domänen des c-Fos Proteins befindet sich im carboxyterminalen Ende (Wilson et al, 1988; Ofir et al., 1990; Guis et al., 1990; Abate et al., 1991). Um die möglichen Phosphorylierungsstellen zu lokalisieren, wurden daher Deletionsmutanten im Carboxy-Terminus des c-Fos Proteins hergestellt. Die einzelnen Mutanten sind in der Abb. 14 zu sehen. Die Expression der Proteine erfolgte, wie bei den zuvor benutzten Expressionsvektoren, unter der Kontrolle des RSV Promotors. Die Versuchsanordnung und Durchführung war die Gleiche wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit dem c-Fos Wildtyp. Die Zellen wurden 20 Minuten mit TPA behandelt. Der Verdau der Proteine erfolgte mit Chymotrypsin.

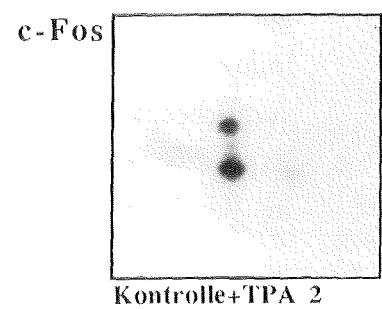
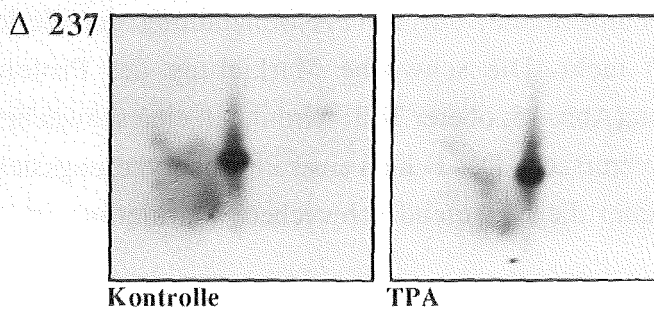
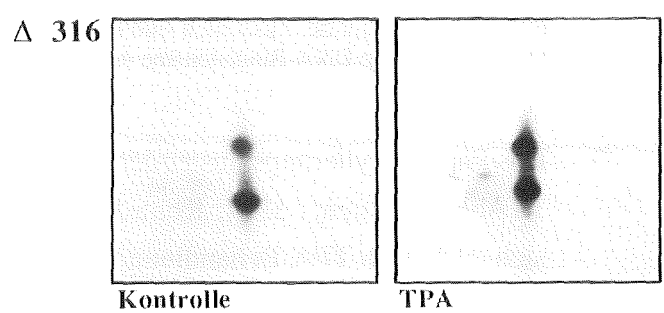
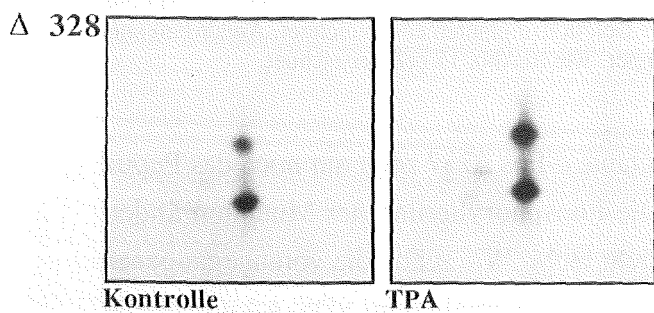
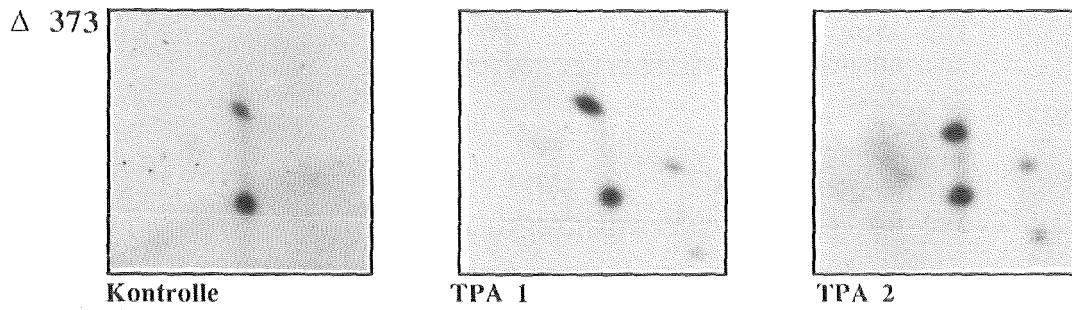
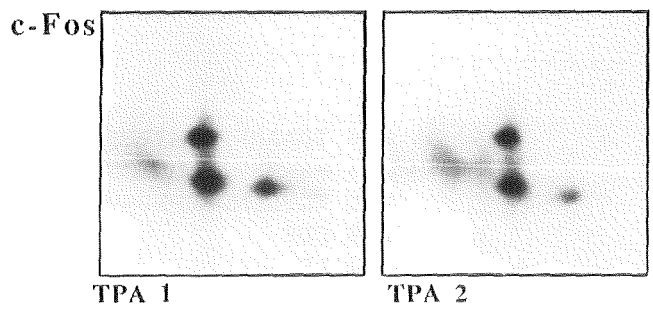
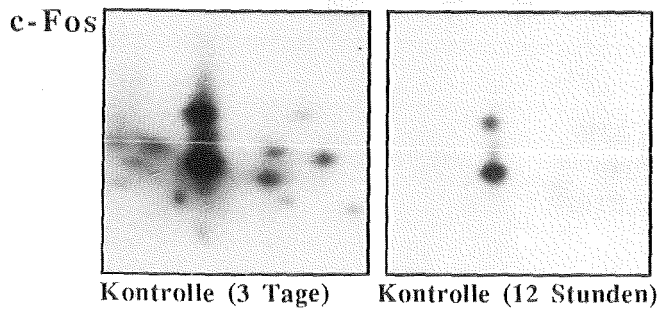
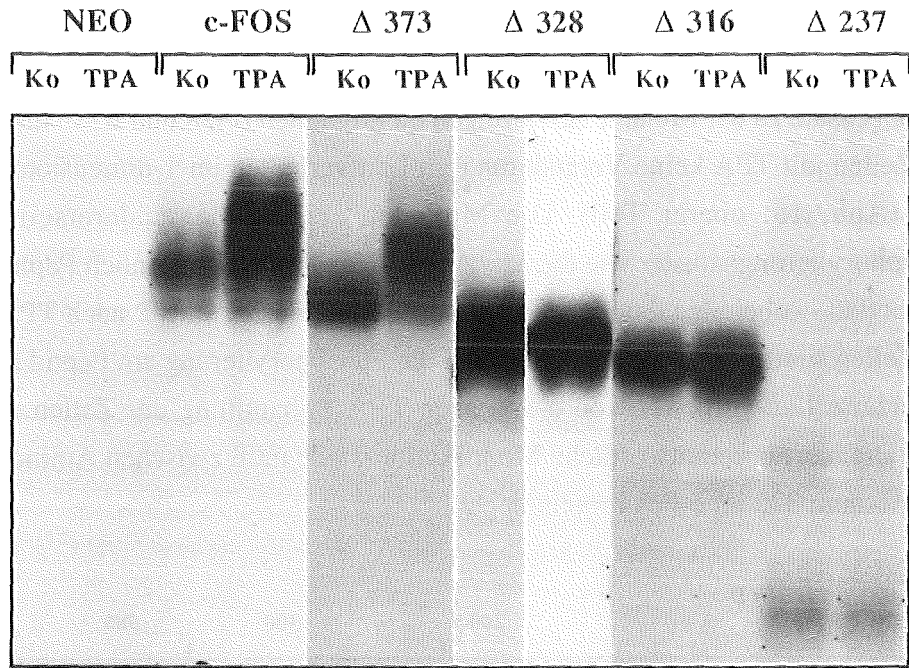
Abb. 15 zeigt im oberen Teil wiederum das Autoradiogramm der Nitrozellulosemembran. In Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden (Abb. 15: Neo: Ko, TPA), befinden sich unter diesen Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an endogenem c-Fos Protein. Das c-Fos Wildtyp Protein aus TPA-behandelten Zellen zeigt ebenso wie die Mutante $\Delta 373$ die charakteristische Veränderung des Laufverhaltens im SDS-AA-Gel (Abb. 15: c-Fos: Ko, TPA und $\Delta 373$: Ko, TPA). Die Mutanten $\Delta 328$, $\Delta 316$ und $\Delta 237$ zeigen dagegen diese Modifikation nach TPA-Induktion der Zellen nicht mehr. Auch die Mutante $\Delta 237$ zeigt keine Veränderung im Laufverhalten nach TPA-Induktion der Zellen. Inwieweit die deutlich schwächere Markierung durch ^{32}P auf einer schwächeren Expression oder auf geringerem Phosphateinbau beruht, wird in den Peptid Kartierungen geklärt.

Im unteren Teil der Abbildung 15 sind die Phosphorylierungsmuster der einzelnen, aus der Nitrozellulose ausgeschnittenen, Proteine zu sehen. Das c-Fos Wildtyp Protein (nur mit c-Fos bezeichnet) zeigt das aus den vorhergegangenen Versuchen bekannte Phosphorylierungsmuster. Die kürzere Exposition der DC-Platten mit c-Fos Wildtyp Protein aus unbehandelten Zellen (Abb. 15: c-Fos, Kontrolle (12 Stunden)) macht den Unterschied in der Phosphorylierung von Peptid 2 im Vergleich zu dem Peptid aus TPA-behandelten Zellen deutlich (Abb. 15: c-Fos, TPA 1, TPA 2). Daß es sich hierbei tatsächlich um eine verstärkte Phosphorylierung am Peptid 2 handelt und nicht etwa am Peptid 3 oder einem bis dahin nicht markierten Peptid zeigt ein Mischexperiment (Abb. 15 rechts unten: Kontrolle + TPA 2). Dabei wurden gleiche radioaktiven Mengen an c-Fos Peptiden aus Kontrollzellen und aus TPA-induzierten Zellen (TPA 2) vermischt, auf die DC-Platte aufgetragen und zusammen in der 2-dimensionale Auftrennung analysiert. Das

Verdau-Muster zeigt lediglich drei verschiedene Peptide (1, 2 und 5). Das bedeutet, daß durch die TPA-Induktion keine zusätzliche Phosphorylierungsstelle entstanden ist. Auch ist es nicht möglich, daß Peptid 2 nach TPA-Induktion dephosphoryliert wird und Peptid 3 gleichzeitig phosphoryliert. In diesem Fall müßten im Mischexperiment sowohl Peptid 3 als auch Peptid 2 sichtbar sein.

Im Phosphorylierungsmuster von Mutante $\Delta 373$ sind nur noch die Peptide 1 und 2 zu erkennen (Abb.15 mittlerer Bereich: $\Delta 373$ Kontrolle; TPA 1; TPA 2). Die Phosphorylierungsstellen für 3, 5, 7 müssen sich daher im carboxyterminalen Bereich des c-Fos Proteins zwischen Aminosäure 373 bis 380 befinden. Zum besseren Verständnis sind in Abbildung 16 die Schnittstellen von Chymotrypsin im carboxyterminalen Bereich des c-Fos Proteins und die daraus resultierenden Peptide gezeigt. Da $\Delta 373$ die gleiche Änderung im Laufverhalten zeigt wie das Wildtyp Protein können die Phosphorylierungen von Peptid 3, 5 und 7 nicht für das veränderte Laufverhalten von c-Fos nach TPA-Induktion der Zellen verantwortlich sein. Die einzige, nach TPA-Behandlung von Zellen induzierte Phosphorylierung in der Mutante $\Delta 373$ ist die verstärkte Phosphorylierung von Peptid 2. Ebenso wie beim Wildtyp Protein ist auch bei der Mutante $\Delta 373$ keine Veränderung im Phosphorylierungs-Muster zu erkennen, wenn Protein aus verschiedenen Molekulargewichtsbereichen analysiert wird (Abb. 15: mittlerer Bereich: $\Delta 373$ TPA 1, TPA 2). Außerdem fällt auf, daß die für den Wildtyp gezeigte Heterogenität des Fos Proteins aus Kontrollzellen bei der $\Delta 373$ Mutante nicht mehr sichtbar ist. Die hierfür verantwortlichen Phosphorylierungen müssen daher alle im carboxyterminalen Ende des c-Fos Proteins liegen.

Abb. 15: Die Analyse der c-Fos Deletionsmutanten ermöglicht die Kartierung der Modifikationsstellen im Carboxy-Terminus des c-Fos Proteins. 2.5×10^5 GM637 Zellen wurden mit jeweils 4 μg Expressionsvektor, der angegebenen c-Fos Deletionsmutanten (siehe auch Abb. 15), sowie einer Kontrolle (NEO) transfiziert. Die Weiterbehandlung der Zellen erfolgte wie bei Abb. 10 beschrieben. Nach der Inkubation mit ^{32}P Orthophosphat wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml Medium) behandelt oder nicht behandelt. Nach 20 min wurden die Zellen geerntet. Aus den RIPA-Extrakten wurden die verschiedenen Fos Proteine mit einem spezifischen Antikörper (anti Fos X4B) präzipitiert und auf einem 10 %igen SDS-AA-Gel aufgetrennt. Die Weiterverarbeitung, sowie die Peptid-Kartierung erfolgte wie bei Abb. 8 beschrieben. Der Verdau der Proteine wurde mit $2 \times 5 \mu\text{g}$ Chymotrypsin durchgeführt. Der obere Teil der Abb. 15 zeigt das Autoradiogramm des Nitrozellulosefilters. Die Proteine wurden ausgeschnitten und weiterverarbeitet. Lediglich bei c-Fos Wildtyp (TPA) und der Mutante $\Delta 373$ (TPA) wurden zwei unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche ausgeschnitten. Die Bereiche sind durch Punkte gekennzeichnet. Der untere Bereich zeigt die Peptidmuster der Proteine. Es wurden durchschnittlich 800 cpm auf die DC-Platten aufgebracht, bei der Mutante $\Delta 237$ ~250 cpm. Wenn nicht anders angegeben betrug die Expositionszeit 24 Stunden. Die DC-Platten mit dem Peptidmuster der c-Fos Mutanten $\Delta 237$ wurden 10 Tage exponiert. Ko: Kontrolle.



Im Gegensatz zu der Mutante $\Delta 373$ zeigen die Mutanten $\Delta 328$ und $\Delta 316$ nach Behandlung der Zellen mit TPA keine Veränderung im Laufverhalten im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel (Abb. 15: oberer Teil). Die Mutanten zeigen aber andererseits das gleiche Phosphorylierungsmuster wie die Mutante $\Delta 373$. Das heißt, nur noch Peptid 1 und 2 sind vorhanden, wobei eine deutliche Phosphorylierung des Peptids 2 nach TPA-Behandlung der Zellen stattfindet. Folglich kann auch die Phosphorylierung am Peptid 2 nicht für das veränderte Laufverhalten von c-Fos nach TPA-Behandlung der Zellen verantwortlich sein. Die hierfür verantwortliche Modifikationsstelle muß zwischen Aminosäure 328 und Aminosäure 372 im c-Fos Protein liegen.

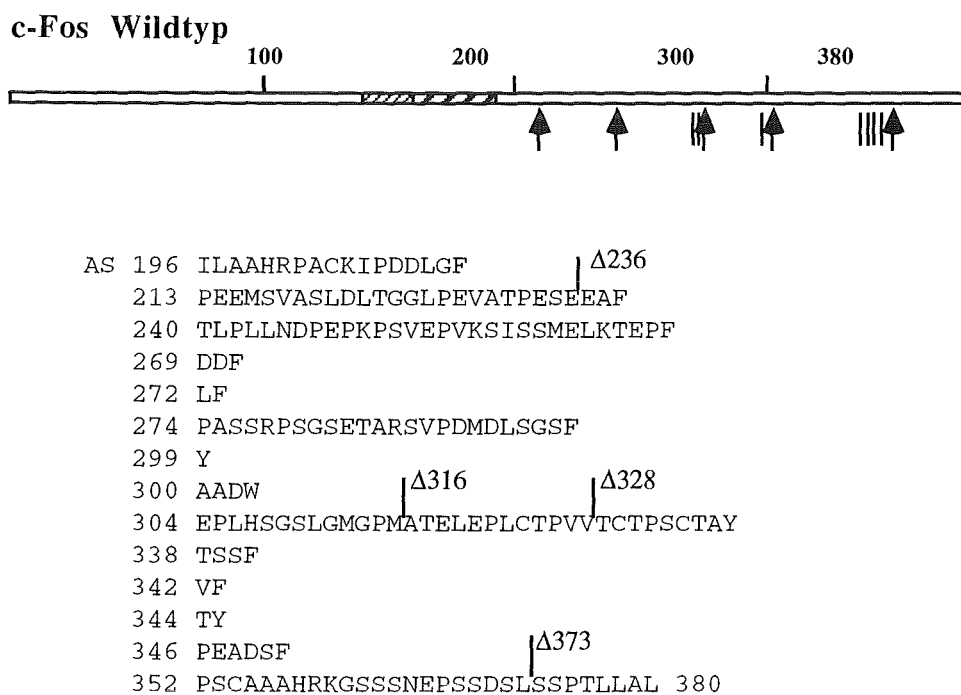


Abb. 16: Schnittstellen von Chymotrypsin im Carboxy-Terminus des c-Fos Proteins und die daraus resultierenden Peptide. Zusätzlich sind die Grenzen der Deletionsmutanten eingezeichnet. Außerdem sind im c-Fos Wildtyp DNA-Bindedomäne und 'Leucine Zipper' wie in Abb. 15 gekennzeichnet.

Das Phosphorylierungsmuster der Deletionsmutante c-Fos $\Delta 237$ zeigt nur noch das Peptid 1 (Abb. 15 unten: $\Delta 237$: Kontrolle, TPA). Die Phosphorylierung der Mutanten ändert sich auch nach TPA-Behandlung von Zellen nicht mehr. Wie schon die vorangegangenen Mutanten, zeigt auch c-Fos $\Delta 237$ kein verändertes Laufverhalten im SDS-AA-Gel mehr. Die Mutante c-Fos $\Delta 237$ zeigt demnach die, durch TPA-Behandlung der Zellen induzierten, Modifikationen nicht mehr. Die schwache Markierung des Proteins verglichen mit den anderen Mutanten (Abb. 15: oberer Teil) wird durch eine schwächere Expression oder geringere Stabilität verursacht. Das Fehlen einer Phosphorylierungsstelle im Vergleich zur Mutante $\Delta 316$ kann die bedeutend schwächere Markierung im 1-

dimensionalen SDS-AA-Gel nicht erklären (Abb.15: oberer Teil: vergleiche $\Delta 237$ und $\Delta 316$)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich im carboxyterminalen Bereich des c-Fos Proteins die Bereiche befinden, die nach TPA-Induktion der Zellen modifiziert werden. Die Aminosäuren, welche für die starke Veränderung im Laufverhalten im SDS-AA-Gel verantwortlich sind, befinden sich zwischen Aminosäure 328 und 373. Phosphorylierungsstellen, die nach TPA-Induktion der Zellen verändert werden, befinden sich im Carboxy-Terminus des Proteins (Aminosäure 370 bis 380) und zwischen Aminosäure 236 und 316.

3. Bedeutung der Modifikationen

3.1. Analyse der chimären GAL4-c-Fos Proteine

Die TPA-Behandlung von Zellen führt zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster und zu einer weiteren noch nicht identifizierten Modifikation des c-Fos Proteins. Um die Bedeutung dieser Modifikationen für die Transkriptionsregulation durch c-Fos zu erfassen, wurden die transaktivierenden Fähigkeiten der c-Fos Mutanten in unbehandelten und TPA-behandelten Zellen untersucht.

C-Fos ist jedoch nicht in der Lage die TRE abhängige Induktion von Genen, wie der Kollagenase, allein zu vermitteln. Erst durch die Interaktion mit c-Jun ist es für das c-Fos Protein möglich, als Heterodimer an das TRE zu binden und die Transkription der nachfolgenden Gene zu induzieren (Lucibello et al., 1988; Turner und Tjian, 1989). Um ausschließlich die Wirkung der c-Fos Transaktivierungsdomänen zu untersuchen, könnte man die c-Fos Mutanten zusammen mit einer Jun Mutante, deren Transaktivierungsdomäne mutiert ist, in einer transienten Expression austesten. Das Problem bei einem solchen Versuchsansatz ist jedoch, daß durch die TPA-Behandlung auch endogenes c-Fos und c-Jun Protein aktiviert wird, und dies die Effekte des exogenen Proteins beeinflussen kann. Das Austesten der Konstrukte in F9 Zellen (Ofir et al., 1990; Hirai et al., 1990), die keine nachweisbaren Mengen an c-Fos und c-Jun besitzen, ist nicht möglich, da diese Zellen nicht in der Lage sind, das c-Fos Protein ähnlich wie HeLa Zellen zu modifizieren (Abb. 5).

Die Lösung dieses Problems gelang durch die Herstellung von chimären Proteinen. Diese bestanden aus der DNA Bindedomäne des Hefe Transkriptionsfaktors GAL4 und den verschiedenen c-Fos Mutanten oder dem c-Fos Wildtyp. GAL4 vermittelt, über die Bindung an spezifische DNA-Elemente die Induktion verschiedener Hefe-Gene durch Galaktose (Giniger et al., 1985; Bram et al., 1986). Das Fusionsprotein enthält nur die GAL4-DNA-Bindedomäne. Mit dieser Domäne bindet das Fusionsprotein an ein GAL4 spezifisches DNA-Element auf einem Indikatorplasmid ('17 mer Bindestelle'; Webster et al., 1988). Die transkriptionelle Aktivierung des Indikator-Gens, in diesem Falle des bakteriellen CAT-Gens, erfolgt durch die Transaktivierungs-Domänen der verschiedenen Fos Proteine. Die CAT-Aktivität im Zellysat ist ein direktes Maß für die transkriptionelle Aktivität der c-Fos Mutanten.

Die Herstellung von chimären Proteinen ermöglicht es, die transaktivierenden Fähigkeiten

der c-Fos Mutanten unabhängig von c-Jun oder endogenen Proteinen auszutesten. Desweiteren ist es dadurch erstmals möglich auch die Wirkung der TPA-Induktion auf die transaktivierende Fähigkeit von c-Fos zu testen.

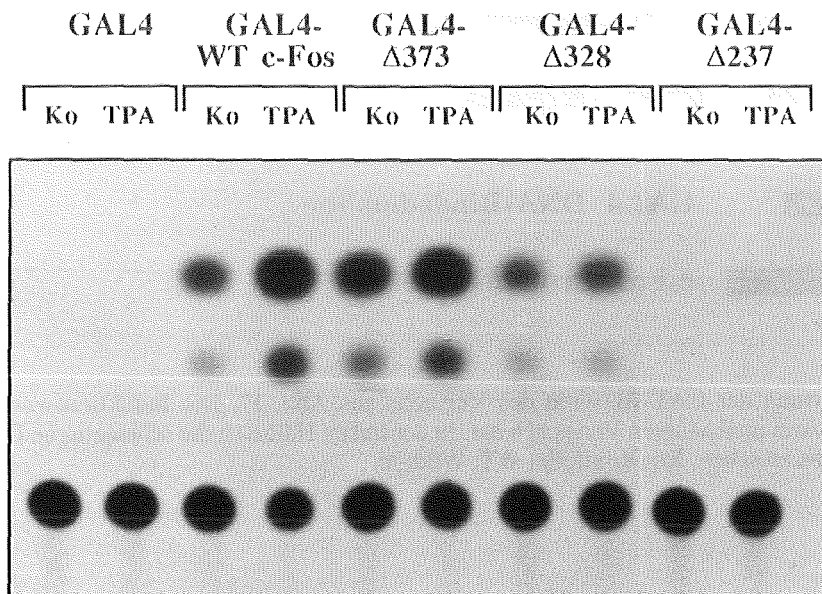









Abb. 17: Die Transaktivierungsdomänen von Wildtyp c-Fos Protein und die Mutante $\Delta 373$ werden durch TPA-Behandlung der Zellen aktiviert. 9×10^5 GM637 Zellen wurden mit $1.5 \mu\text{g}$ 17mer-tk-CAT Indikatorplasmid (Webster et al., 1988), $3.5 \mu\text{g}$ RSV 0 Plasmid und jeweils $5 \mu\text{g}$ des angegebenen RSV GAL4 c-Fos Plasmides transfiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Medium mit 0.5% FCS weiterinkubiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml Medium) induziert oder zur Kontrolle nicht induziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet. Die CAT Aktivität wurde aus $10 \mu\text{g}$ Zellextrakt bestimmt. Ko: Kontrolle; GAL4: Kontrollplasmid, das nur die GAL4 DNA Bindedomäne exprimiert.

Die Konstrukte wurden zusammen mit dem Indikatorplasmid in GM637 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden danach gewaschen und mit Medium, das 0.5 % FCS enthielt, inkubiert. Die Induktion mit TPA erfolgte unmittelbar danach. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität in den Zellysaten bestimmt.

		CAT-Aktivität (pmol/mg x min)		
		Ko	TPA	Induktionfaktor
GAL4		3.5	2.6	—
GAL4-c-Fos WT		265	1050	4.2
GAL4-Δ373		406	796	2.2
GAL4-Δ328		119	148	1.1
GAL4-Δ237		4.2	6.5	—

 GAL4 DNA-Bindedomäne
 c-Fos Proteinsequenzen

Tab. 1: Auswertung der CAT-Aktivität des Versuchs aus Abb. 17. Die Induktionswerte stellen den Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar. In der linken Hälfte ist die schematische Darstellung der chimären Proteine zu sehen. Ko: Kontrolle, WT: Wildtyp.

Bis auf die Mutante GAL4-Δ237 und die GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4) sind alle chimären Proteine in der Lage, die Transkription des Indikatorgens zu induzieren. Die Mutante Δ237 zeigt weder in unbehandelten noch in TPA-behandelten Zellen eine Transaktivierung (Abb.17 und Tabelle 1). Dies beweist, daß die transaktivierenden Domänen des c-Fos Proteins im carboxyterminalen Bereich liegen. Die Mutante Δ373 hat in TPA behandelten Zellen eine ähnlich hohe Aktivität wie das Wildtyp Protein und ist auch induzierbar (Abb.17). Folglich befindet sich im carboxyterminalen Ende (AS 373 - AS 380) keine Transaktivierungsdomäne. Stattdessen könnte sich hier eine reprimierende Domäne befinden, die auch für die niedrige Aktivität des Wildtyp-Protein in unbehandelten Zellen gegenüber der Mutante Δ373 verantwortlich ist.

Die Mutante GAL4-Δ328 hat in unbehandelten Zellen noch ungefähr 25% der Transaktivierungsaktivität von GAL4-Δ373. Da die Mutante Δ237 keinerlei Aktivität hat, befindet sich zwischen Aminosäure 237 und 328 eine Transaktivierungsdomäne. Die Mutante GAL4-Δ328 wird jedoch in TPA-behandelten Zellen nicht aktiviert. Dies bedeutet wiederum, daß sich die Domänen, die die TPA-Induktion vermitteln, im Bereich zwischen Aminosäure 328 und 373 befinden (Abb. 17 und Tab. 1). Interessanterweise befindet sich jedoch in diesem Bereich keine Phosphorylierungsstelle, da die Mutante

$\Delta 328$ und $\Delta 373$ das gleiche Phosphorylierungs-Muster zeigen, welches sich auch nach TPA Induktion nicht verändert (Abb. 15). Ein offensichtlicher Unterschied zwischen der Mutante $\Delta 328$ und $\Delta 373$ ist das veränderte Laufverhalten im SDS-AA-Gel nach TPA Behandlung der Zellen. Die Aktivierung der Proteine nach TPA-Induktion der Zellen verläuft wahrscheinlich über diese Modifikation.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es gelungen ist, die Transaktivierungs-Fähigkeit der c-Fos Deletionsmutanten mit Hilfe von chimären Proteinen zu testen. Dabei zeigte sich, daß sowohl im Bereich zwischen Aminosäure 237 und 328 als auch im Bereich zwischen Aminosäure 328 und 373 eine Transaktivierungsdomäne liegt. Die Domäne des Proteins, die durch die TPA-Induktion von Zellen aktiviert wird, befindet sich ebenfalls zwischen Aminosäure 328 und 373. Im Bereich zwischen AS 373 und AS 380 befindet sich dagegen möglicherweise ein reprimierende Domäne.

Diskussion

Der Transkriptionsfaktor AP-1 hat eine zentrale Bedeutung bei der schnellen Antwort der Zelle auf veränderte Umwelteinflüsse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß AP-1 posttranslational unter dem Einfluß der veränderten Umwelt, in diesem Fall TPA und UV, modifiziert wird. Die Modifikationen an den beiden Untereinheiten von AP-1, c-Fos und c-Jun finden innerhalb von wenigen Minuten statt und führen zur transkriptionellen Aktivierung des Kollagenase-Gens. Außerdem sind sie wahrscheinlich auch für autoregulatorische Prozesse von c-Fos und c-Jun auf die Expression der eigenen Gene von Bedeutung.

Modifikation von c-Jun durch TPA

Die TPA-induzierten Modifikationen am c-Jun Protein erscheinen vordergründig betrachtet widersprüchlich. Die Analyse der Modifikation in der Peptid-Kartierung zeigte, daß c-Jun nach TPA-Induktion gleichzeitig phosphoryliert und dephosphoryliert wird. Wie können zwei gleichzeitige, gegenläufige Prozesse wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung das c-Jun Proteins aktivieren? Möglicherweise durch die Veränderung völlig separater Funktionen und Domänen des Transkriptionsfaktors. Transkriptionsfaktoren besitzen die Fähigkeit, einerseits an eine bestimmte DNA-Sequenz im Promotor von Genen zu binden (DNA bindende Domäne), und zum anderen die Transkription dieser Gene zu induzieren (Transaktivierungsdomäne). Durch Dephosphorylierung im Bereich der DNA-Bindedomäne würde das Protein in diesem Bereich basischer und könnte besser an die DNA binden. Eine Phosphorylierung im Bereich der Transaktivierungsdomäne könnte die Kopplung an die RNA Polymerase II über einen Kofaktor ermöglichen (Berger et al., 1990). Die Phosphorylierung würde eine saure Transaktivierungsdomäne erzeugen, die in anderen Transkriptionsfaktoren konstitutiv als Domäne saurer Aminosäuren vorliegt. (Ptashne, 1988; Mitchell und Tjian, 1989). Die Kartierung der Modifikationsstellen mit Hilfe der Jun Mutanten zeigt, daß die durch TPA-Induktion phosphorylierten Peptide *x* und *u* im aminoterminalen Bereich des c-Jun Proteins liegen. Hier befinden sich auch die Transaktivierungsdomänen von c-Jun (Angel et al., 1989). Die 'Phosphoisomere' *a*, *b*, *c*, welche möglicherweise im Bereich der DNA-Bindedomäne lokalisiert sind, werden dagegen nach TPA-Induktion am Peptid

a dephosphoryliert. Es ist daher wahrscheinlich, daß sowohl die Phosphorylierung als auch die Dephosphorylierung von *c-Jun* Teilprozesse der Aktivierung des Proteins darstellen. Dies bedeutet auch, daß die TPA-induzierte Signalkette zur Aktivierung sowohl von Phosphatasen und als auch von Proteinkinasen im Kern führen muß.

Die Arbeitsgruppen um M. Karin und T. Hunter beschäftigen sich ebenfalls mit der Modifikation von *c-Jun*. Die Benennung der Peptide mit *a*, *b*, *c* und *X*, *Y* durch Boyle et al. wurde inzwischen allgemein übernommen. Sie beschreiben in ihrer Arbeit die schnelle Dephosphorylierung des Peptids *a* nach TPA Induktion (Boyle et al., 1991). Sie können u. a. zeigen, daß *a*, *b* und *c* tatsächlich 'Phosphoisomere' des gleichen Peptids sind, welches von AS 227 bis AS 252 reicht. Außerdem zeigen sie, daß die Dephosphorylierung von *a* zu einer erhöhten Binfähigkeit des Proteins an ein TRE Oligonukleotid führt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Phosphorylierung des Peptides *x* (bei Boyle et al. *X*) durch TPA-Behandlung der Zellen wird bei Boyle et al. im Zusammenhang mit der TPA-Induktion nicht erwähnt, sondern in einer späteren Veröffentlichung als Ha-Ras spezifische Induktion von *c-Jun* beschrieben (Binétry et al., 1991). Ha-Ras ist ein membrangebundenes Onkoprotein mit GTPase Aktivität (Buss und Shefton, 1986; Marshall, 1991). Es führt genau wie TPA zu einer Aktivierung der Protein Kinase C und des Phosphatidylinositol-Umsatzes (Lacal et al., 1987; Wolfman und Macara, 1987). Die Aktivierung der gleichen Signalkette wie TPA sollte daher auch zur gleichen Modifikation an *c-Jun* (Phosphorylierung von *x*) führen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Der von Binétry et al. vorgeschlagene Weg einer PKC abhängigen und unabhängigen Ha-Ras Induktion erscheint eher unwahrscheinlich.

In einer dritten Arbeit, die sich mit der Modifikation von *c-Jun* befaßt (Pulverer et al., 1991) ist es gelungen, die Phosphorylierungsstellen für *x* und *u* (bei Pulverer und Boyle als *Y* bezeichnet) im Jun Protein zu lokalisieren und die möglicherweise verantwortliche Proteinkinase zu identifizieren. Die MAP Kinase phosphoryliert *in vitro* die Peptide *x* und *Y* an den AS 62 und 72. Sie wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, TPA und Ha-Ras aktiviert und als sog. 'Switch' Kinase bezeichnet, da sie, als Serin/Threonin Kinase eine Tyrosin-Phosphorylierung zur Aktivierung benötigt. Rezeptoren in der Zellmembran besitzen meist Tyrosin Kinase Aktivität, während beispielsweise für die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Kern Serin/Threonin Kinasen benötigt werden. Die MAP Kinase kann beide Teile der Signalkette miteinander verknüpfen (Payne et al., 1991). Ob die MAP Kinase jedoch tatsächlich die TPA-Induktion vermittelt, ist noch nicht geklärt. In den im Folgenden beschriebenen Transaktivierungsdomänen von *c-Fos* befinden sich keine Erkennungssequenzen für die MAP Kinase.

Die Daten aus den diskutierten Publikationen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wonach die TPA-Behandlung von Zellen zu einer Dephosphorylierung von a in einem Bereich nahe der DNA-Bindedomäne führt. Außerdem wurde die Kartierung der Phosphorylierungsstellen für x (AS 72 bis AS 146) und u (AS 6 bis 72) durch die Ergebnisse von Pulverer et al. bestätigt.

Modifikation von c-Jun durch UV

UV-Bestrahlung führt wie TPA-Induktion zu einer schnellen Modifikation von c-Jun. Dabei zeigen sich sowohl im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel als auch in der Peptid Kartierung Unterschiede zu der TPA induzierten Modifikation. Das Auftreten von zwei zusätzlichen Phosphorylierungen (Peptid u und v) in der Peptid-Kartierung des endogenen c-Juns äußert sich in einem verlangsamten Laufverhalten im SDS-AA-Gel. Das Peptid u (Y) war schon in Zusammenhang mit der Ha-Ras Induktion und der Modifikation durch TPA und MAP Kinase von Binétry et al. und Pulverer et al. beschrieben worden. Die Phosphorylierung am Peptid v wurde dagegen in diesem Zusammenhang nicht entdeckt, sondern in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

Interessanterweise konnte sowohl das veränderte Laufverhalten von c-Jun im 1-dimensionalen SDS-AA-Gel, als auch das Auftreten von Peptid v in der Peptid-Kartierung in Adenovirus E1A transformierten Zellen nachgewiesen werden (B. Hagemeyer, Leiden, Niederlande, unveröffentlicht). Obwohl E1A die Transaktivierungsfähigkeit von c-Jun induziert (P. Angel, unveröffentlicht), wird das Kollagenase-Gen durch E1A reprimiert (Offringa et al., 1990). Diese Hemmung verläuft wahrscheinlich, unabhängig von Phosphorylierungen in der Transaktivierungsdomäne von c-Jun, über die DNA-Bindedomäne in c-Jun/c-Fos Heterodimeren. Dagegen führt die Aktivierung von c-Jun durch E1A zur Induktion anderer Gene, darunter auch das c-jun Gen (van Dam, 1991).

UV-Bestrahlung könnte ebenso wie E1A über Phosphorylierung der Transaktivierungsdomänen von c-Jun zur Induktion des c-jun Gens führen. Bemerkenswerterweise führt UV zu einer mindestens 10 fach stärkeren Induktion des c-jun im Vergleich zu TPA (Stein et al., 1991). Der offensichtliche Unterschied zwischen TPA- und UV-Induktion besteht in der Phosphorylierung des Peptids v in Folge der UV-Behandlung. Die Induktion des c-jun Gens erfolgt über zwei DNA-Elemente, die TRE-ähnliche Sequenzen besitzen und an die Proteine aus der Jun Familie binden (Stein et al., 1991). Dies könnte möglicherweise

auch modifiziertes c-Jun sein. UV-induzierte Zellen enthalten, neben der stark modifizierten c-Jun Spezies, auch c-Jun Protein, das in gleicher Weise wie nach TPA-Induktion der Zellen modifiziert ist. Möglicherweise ist diese c-Jun Spezies für die Interaktion mit c-Fos und für die Induktion des Kollagenase-Promotors verantwortlich. UV würde somit zwei Modifikationsformen von c-Jun aktivieren, die einerseits zusammen mit c-Fos das Kollagenase-Gen induzieren und zum anderen das c-jun Gen induzieren.

Der Verlauf der Signalkette von der UV-Bestrahlung der Zellen bis zur schnellen Modifikation von c-Jun ist noch nicht vollständig verstanden. Die Schädigung der DNA konnte als primäre Ereignis der UV-Induktion identifiziert werden. Daneben sind jedoch auch zytoplasmatische und möglicherweise auch extrazelluläre Ereignisse in die Signalkette involviert (siehe Einleitung). So konnte gezeigt werden, daß nach UV-Bestrahlung die Zellen die Wachstumsfaktoren Interleukin-1 α und bFGF ins Medium abgeben. Durch diese Faktoren kann die UV Antwort in unbestrahlten Zellen ausgelöst werden (Krämer, 1991). Es wird jedoch auch die Möglichkeit diskutiert, daß aktivierte Wachstumsfaktoren die Zelle nicht verlassen, sondern noch in der Zelle an ihren spezifischen Rezeptoren binden und eine Signalkette induzieren (Yayon und Klagsbrun, 1990a, b)

Möglicherweise könnte ein solcher intrazellulärer Kurzschluß eines aktivierten Wachstumsfaktors zu einer schnellen Modifikation von Transkriptionsfaktoren führen. Neuere Experimente zeigen, daß IL-1 α zur gleichen Modifikation am c-Jun führt wie UV-Strahlung (C. Sachsenmaier, unveröffentlichte Daten). Die schnelle Modifikation von c-Jun durch IL-1 α könnte in der Tat die schnelle und primäre Reaktion der Zelle auf UV-Bestrahlung widerspiegeln: UV würde über die Aktivierung eines IL-1 α Rezeptorkomplexes wirken. Dieser müßte zur Aktivierung einer anderen Signalkette führen wie TPA.

Modifikation von c-Fos nach TPA

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, die Modifikationen des endogenen konstitutiv exprimierten c-Fos zu analysieren. Aufgrund der hier ausgearbeiteten Versuchsbedingungen - metabolische Markierung des konstitutiv exprimierten Proteins, und anschließende kurze Induktion der Zellen, wobei die Neusynthese von Proteinen

ausgeschlossen ist - können die Modifikationen von c-Fos und c-Jun direkt mit der Fähigkeit der Proteine zur Transaktivierung und zur Vermittlung der TPA- und UV-induzierten Kollagenase-Genexpression korreliert werden. C-Fos und c-Jun aus nichtinduzierten Zellen sind, von einem geringen Basalwert abgesehen, nicht in der Lage die Transkription des Kollagenase-Gens zu induzieren. C-Fos und c-Jun aus Zellen, die nur 15 Minuten mit TPA induziert wurden, können dagegen die Transkription des Kollagenase-Gens induzieren. In früheren Arbeiten, die sich ebenfalls mit der posttranslationalen Modifikation von c-Fos beschäftigten, wurden Bedingungen gewählt, unter denen große Mengen an Fos Protein zur Verfügung standen. Bei dem untersuchten c-Fos Protein handelte es entweder um neusynthetisiertes Protein (Kruijer et al., 1984; Müller et al., 1984; Müller et al., 1987; Franza et al., 1988), um c-Fos Protein aus Zellen die transient oder stabil mit c-Fos Expressionsvektoren transfiziert worden waren (Curran et al., 1984; Barber und Verma 1987; Lee et al., 1988) oder um in vitro, im Retikulozyten-Lysat exprimiertes c-Fos Protein (Curran et al., 1987). Diese Arbeiten lassen nur eine sehr beschränkte Aussage auf die Bedeutung der Modifikationen zu.

Die genaue Analyse der Modifikationen durch Peptid-Kartierung von endogenem c-Fos sowie transient exprimierter c-Fos Mutanten ermöglichte ihre Lokalisation im Protein zu bestimmen. C-Fos kann alleine nicht an DNA binden. Erst in Form eines Heterodimer mit c-Jun zusammen ist c-Fos in der Lage an die DNA zu binden und Gene zu aktivieren. Mit Hilfe der, in der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten chimären GAL4-c-Fos Proteinen war es erstmals möglich, die transaktivierenden Fähigkeiten von c-Fos Mutanten direkt zu erfassen, ohne daß eine Dimerisierung mit c-Jun nötig war.

C-Fos wird nach TPA-Induktion an verschiedenen Stellen im Carboxy-Terminus modifiziert. Im extremen C-Terminus von AS 360 bis AS 380 des c-Fos Proteins sind 40% der Aminosäuren Serine, und somit auch mögliche Phosphorylierungsstellen. In der Mutante $\Delta 373$ ist ein Teil dieses Bereiches deletiert. Dies führt zum Verlust von mindestens zwei Phosphorylierungsstellen. Trotzdem kann das GAL4- $\Delta 373$ Protein noch die Transkription des Indikator-Gens aktivieren und die TPA Induktion vermitteln. Die Phosphorylierungsstellen im Carboxy-Terminus haben folglich keine Bedeutung für die Transaktivierungsfähigkeiten von c-Fos und ihre Aktivierung durch TPA-Behandlung von Zellen.

Stattdessen sind diese Modifikationen wahrscheinlich wichtig für die Regulation des c-fos Promotors durch das c-Fos Protein. Verschiedene Gruppen haben die Notwendigkeit des Carboxy-Terminus für die Autorepressions-Vorgänge von c-Fos dokumentiert. (Wilson und Treisman 1988; Lucibello et al., 1989; Guis et al., 1990). Desweiteren werden auch

die Transformationseigenschaften von ν -Fos teilweise auf die Mutation im Carboxy-Terminus und die daraus resultierende Unfähigkeit, das Fos Gen zu reprimieren, zurückgeführt. (Wilson und Treisman, 1988). Nach Mutation der Serine im Carboxy-Terminus sind die mutierten Proteine nicht mehr in der Lage, die Serum-Induktion des c-Fos Gens zu hemmen. Andererseits können die gleichen Mutanten gemeinsam mit c-Jun in F9 Zellen die Expression eines CAT-Gens unter der Kontrolle eines multimeres TRE's induzieren (Ofir et al., 1990). Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wonach die Phosphorylierung im Bereich zwischen AS 373 und AS 380 des c-Fos Proteins keine Bedeutung für die Transaktivierung des Kollagenase-Gens haben. Repression und Induktion sind folglich verschiedene Prozesse, die möglicherweise auch unabhängig voneinander induziert werden können.

Die Analyse der Transaktivierungsdomänen des c-Fos geht von der Mutante Δ 237 aus, die keinerlei Transaktivierungsfähigkeit mehr besitzt und auch keine TPA-induzierte Modifikation mehr erfährt. Folglich befinden sich die Transaktivierungsdomänen des c-Fos wahrscheinlich zwischen AS 237 und 372. Zum gleichen Ergebnis, in bezug auf die aminoternale Begrenzung der Transaktivierungsdomäne, kamen Hirai et al., die die Transaktivierungsfähigkeit einer c-Fos Mutante, deren carboxyterminaler Bereich bis zur Aminosäure 207 deletiert war, untersuchten. Diese Mutante war nicht mehr in der Lage, gemeinsam mit c-Jun die Transkription eines AP-1 abhängigen Indikator-Gens zu steigern (Hirai et al., 1990). In vitro Transkriptions-Experimente, in denen die Transaktivierungsfähigkeit von bakteriell exprimierten c-Fos und c-Jun Mutanten getestet wurden, führen zur Definition verschiedener induzierender und hemmender Domänen im amino- und carboxyterminalen Bereich des Fos Gens. Die Ergebnisse sind jedoch nur schwer zu analysieren, da die Versuche in HeLa Zellextrakten gemacht wurden, und eine Interaktion mit endogenem c-Fos und c-Jun nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (Abate et al., 1991). Die Untersuchung der Transaktivierungsfähigkeit des viralen Fos führte zur Definition von drei Aktivierungsdomänen (Lucibello et al., 1991). Zwei Domänen beinhalten ν -Fos spezifische Mutanten bei Position 138 und 288. Als dritte Transaktivierungsdomäne wird der Bereich zwischen AS 220 und 280 definiert. Dies entspricht den Daten der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Hirai et al. (1990). Dieser Bereich ist durch einen hohen Anteil an Prolin und sauren Aminosäuren gekennzeichnet. Dies ist ein Charakteristikum für Transaktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren (Mitchell und Tjian, 1989)

In den oben beschriebenen Arbeiten wurde die Wirkung der c-Fos Mutanten immer im Zusammenspiel mit c-Jun untersucht. Außerdem wurden nur die Basalaktivitäten bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe der GAL4-c-Fos Chimären die c-

Fos Mutanten unabhängig von c-Jun und endogenen Proteinen untersucht werden. Neben den Transaktivierungsdomänen konnten auch erstmals die Bereiche im c-Fos kartiert werden, die durch TPA Induktion aktiviert werden.

Die Mutante $\Delta 328$ hat noch 50% der Transaktivierungsfähigkeit des c-Fos Wildtyps besitzt, andererseits aber keine Induktion durch TPA mehr vermittelt. Zwischen AS 237 und 328 liegt folglich eine Transaktivierungsdomäne. Der Bereich zwischen AS 328 und 372 beinhaltet neben einer weiteren Transaktivierungsdomäne die Domäne, welche die TPA-Induktion vermittelt. Phosphorylierung als Mediator der TPA-Aktivierung kann ausgeschlossen werden, da die Mutanten $\Delta 328$ und $\Delta 372$ das gleiche Phosphorylierungsmuster haben. Ein Unterschied zwischen den beiden Mutanten liegt in dem veränderten Laufverhalten von $\Delta 373$ nach TPA-Induktion. Möglicherweise vermittelt diese Modifikation auch die TPA-Induktion.

Welche Modifikation könnte für das veränderte Laufverhalten von c-Fos nach TPA-Induktion verantwortlich sein? Die Anlagerung von einem Ubiquitin Molekül an ein Protein ist nicht nur im Zusammenhang mit Abbauvorgängen bekannt. Die reversible Monoubiquitinylierung von Histon H2A führt nicht zur Degradation des Histons (Hershko 1988). Ubiquitin bindet an Lysin und führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes um ungefähr 8 kD. Dies entspricht ungefähr auch der Änderung des Laufverhaltens von c-Fos nach TPA Induktion. Im Carboxy-Terminus des c-Fos Genes befindet sich an der Stelle 360 ein Lysin (siehe Abb. 16). Bemerkenswerterweise findet nur bei den Mutanten, in denen das Lysin noch vorhanden ist, eine Veränderung im Laufverhalten statt. Der Nachweis einer Ubiquitinylierung von c-Fos nach TPA-Induktion mit Hilfe von Immunpräzipitationen und Western-Analysen mit Ubiquitin-Antikörpern ist jedoch nicht gelungen.

Desweiteren ist bekannt, daß AP-1 O-glycosyliert ist (Jackson und Tjian, 1988). O-Glycosylierungen finden an Serin und Threonin statt. Dies sind zugleich mögliche Phosphorylierungsstellen. Glykosylierungen und Phosphorylierungen könnten somit gegenläufige Prozesse sein, die um die Modifikation der gleichen Aminosäure konkurrieren und so zur Aktivierung oder Hemmung von Proteinen beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die mögliche Glykosylierung durch Behandlung der Immunpräzipitate mit O-Glycosidasen nachzuweisen, oder die spezifische Bindung von c-Fos aus TPA-induzierten Zellen an eine Lektinsäule zu zeigen. Beide Ansätze führten jedoch zu keinem schlüssigen Ergebnis.

Andere mögliche Modifikationen von c-Fos wie ADP Ribosylierung, n-Glycosylierung,

Adenylierung oder Metylierung sollen laut Barber und Verma im c-Fos Protein nicht auftreten (Barber und Verma, 1987). Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, daß auch eine solche Modifikation für die Veränderung im Laufverhalten von c-Fos und die Vermittlung der TPA-Induktion eine Rolle spielt.

Obwohl die Mutante $\Delta 328$ keine TPA-Induktion mehr vermitteln kann, erfolgt eine TPA-abhängige Phosphorylierung an dem Protein. Möglicherweise kann diese Modifikation dennoch für die Transaktivierung wichtig sein. Die Domäne ist jedoch ohne einen synergistisch wirkende Bereich im deletierten C-Terminus nicht in der Lage, die Induktion zu vermitteln. Die Möglichkeit kann nach der genauen Lokalisation der Phosphorylierungsstelle durch eine Punktmutation geklärt werden.

Modifikation von c-Fos durch UV

Die Veränderung des Phosphorylierungsmuster von c-Fos nach UV-Bestrahlung von Zellen zeigt zwar die gleiche Tendenz, ist jedoch bedeutend schwächer als nach TPA. Die TPA induzierte Veränderung des Laufverhaltens von c-Fos ist nach UV-Bestrahlung überhaupt nicht zu sehen. Falls diese Modifikation tatsächlich für den Großteil der Aktivierung von c-Fos verantwortlich ist, wird die Transaktivierungsfähigkeit von c-Fos durch UV nicht oder nur schwach induziert. Möglicherweise ist dies ein Grund für die schwächere und verzögerte Induktion der Kollagenase durch UV im Gegensatz zu TPA.

Transaktivierung und Transformation

Obwohl Transformation mit Genregulation im Zusammenhang stehen muß, konnten die für die Transaktivierung wichtigen Bereiche von c-Fos bislang nicht direkt mit denen der Transformation korreliert werden (Lucibello et al., 1991). Auch die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Transaktivierungsdomänen korrelieren nicht mit den für die Transformation wichtigen Bereichen (beispielweise AS 110-220; Jenuwein und Müller, 1987). Transformation wird nicht durch die einmalige Induktion des c-Fos Gens ausgelöst, sondern durch die Überexpression des Proteins. Diese Überexpression führt dazu, daß auch andere Transkriptionsfaktoren, mit denen c-Fos interagiert, beeinträchtigt werden und so die Regulationsmechanismen der Zelle an vielen Stellen gestört sind. Daher befinden sich die für die Transformation wichtigen Domänen auch im 'Leucine-

Zipper' (Schuermann et al., 1989) und in Bereichen, die für die Stabilität (Lee et al, 1988; Rahmsdorf et al., 1987) und die Autorepression des Proteins verantwortlich sind (Wilson und Treisman, 1988).

Im aminoterminalen Bereich des c-Juns befinden sich die drei Transaktivierungs-Domänen des Proteins (Angel et al., 1989). Die Deletion dieser Domänen führt zum Verlust der Ha-Ras abhängigen Transformationsfähigkeit von embryonalen Rattenzellen durch die c-Jun Mutanten (Alani et al., 1991). Für c-Jun konnte somit im Gegensatz zu Fos ein direkter Zusammenhang zwischen Transaktivierung und Transformation festgestellt werden. Möglicherweise spielen dabei auch die durch Ha-Ras induzierten Modifikationen eine Rolle. Andererseits führt auch eine Deletion des 'Leucine Zipper' zum Verlust der Transformationsfähigkeit. Wahrscheinlich sind auch bei c-Jun verschiedene Domänen des Proteins notwendig, um die volle Transformationsfähigkeit zu gewährleisten.

Modell der schnellen Genaktivierung durch TPA- und UV-induzierte Modifikationen von AP-1

Die schnelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 durch TPA führt zu einer schnellen Induktion des Kollagenase Gens und anderer AP-1 abhängiger Gene. Diese frühe Aktivierung ist wahrscheinlich notwendig, um die volle Anschaltung des Promotors durch neusynthetisierte Faktoren zu ermöglichen. Die Bedeutung von AP-1 für die Induktion des Kollagenasegens ist demnach einerseits in einer Initiatorfunktion zu sehen, andererseits ist AP-1-Aktivität auch für die langfristige Induktion des Gens absolut notwendig. TRE-Mutationen im sonst intaktem Kollagenasepromoter führen zur vollständigen Inaktivierung des Promotors (Jonat et al., 1990). Möglicherweise sind auch für die langfristige AP-1 Aktivität Modifikationen von Bedeutung. TRE Sequenzen alleine führen nur zu einer transienten Induktion (Maximum bei 2 Stunden), die aber von Proteinneusynthese unabhängig ist und wahrscheinlich durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Modifikationen am AP-1 vermittelt wird (Stein 1990; Jonat et al., 1991).

Neben dieser Initiatorfunktion für AP-1 abhängige Gene spielt die Modifikation von c-Fos und c-Jun möglicherweise auch noch eine Rolle bei der Autoregulation der eigenen Gene. Die Repression der basalen Transkription von c-fos ist vom c-Fos Protein abhängig. Die Inkubation von Zellen mit Antisense c-Fos mRNA führt zur Derepression

des c-fos Promotors (Schönthal et al., 1988b, 1989). Ebenso ist bekannt, daß die Repression des c-Fos Promotors nach TPA-Induktion von der Neusynthese des c-Fos Proteins abhängt (Schönthal et al., 1989). Das heißt, das c-Fos Protein, welches konstitutiv in der Zelle vorliegt, hat reprimierende Eigenschaften. Möglicherweise findet nach TPA eine Modifikation am c-Fos statt, welche diese reprimierende Form des c-Fos Proteins inaktiviert und dazu beiträgt, daß der c-fos Promoter induziert wird. Die Repression erfolgt erst wieder durch das neusynthetisierte c-Fos Protein, welches wieder die reprimierenden Modifikationen trägt. Dies wird auch dadurch bewiesen, daß unter Bedingungen der Proteinsynthese-Hemmung eine Superinduktion des Fos Promotors stattfindet (Rahmsdorf et al., 1987). Möglicherweise vermitteln die im extremen Carboxy-Terminus beobachteten Modifikationen diese Autoregulation des c-fos Gens.

Ebenso könnte die Modifikation von c-Jun durch UV-Bestrahlung das Protein in eine Form überführen, die über die Bindung an ein URE im c-jun Promotor die Induktion des c-jun Gens vermittelt. Neusynthetisiertes Jun Protein würde dann ebenfalls zur Repression führen, da es, aufgrund veränderter Modifikationen, nicht mehr in der Lage ist, an das URE zu binden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Erfassung und Identifikation der schnellen Modifikation von AP-1 nach verschiedenen Induktion der Zellen, die Bedeutung der Modifikationen von AP-1 für die Transkriptionsregulation AP-1 abhängiger Gene gezeigt werden. Darüberhinaus spielen die Modifikationen möglicherweise auch bei Auto-regulationsmechanismen eine Rolle. Die unterschiedlichen Modifikationen von c-Jun und c-Fos in TPA-behandelten oder UV-bestrahlten Zellen zeigt, daß die Signalketten der beiden Induktoren nicht vor AP-1 konvergieren sondern, mittels unterschiedlicher Protein-Kinasen, Phosphatasen oder andere modifizierenden Enzyme den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren und in der Folge die Expression der Kollagenase induzieren.

Wahrscheinlich wirken auch andere Induktoren über die gleichen oder ähnliche Modifikationen. Dies konnte am Beispiel des Adenovirus E1A, des Onkogenproduktes Ha-Ras und des Cytokins Interleukin 1 α schon gezeigt werden. Durch genaue Kartierung der Modifikationsstellen sollte es in der Zukunft gelingen, die für die Modifikation verantwortlichen Enzyme zu identifizieren und somit die Signaltransduktionen der verschiedenen Induktoren weiter zu entschlüsseln.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abate, C., Luk, D. und Curran, T. (1991). Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: Interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3624-3632.
- Alani, R., Brown, P., Binétruy, B., Dosaka, H., Rosenberg, R. K., Angel, P., Karin, M. und Birrer, M.J. (1991). The transactivating domain of the c-Jun Proto-Oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6286-6295.
- Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J. und Bravo R. (1988). Complexity of early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2140-2148.
- 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., Rahmsdorf, H.J., Pötting, A. und Herrlich, P. (1985). C-Fos m-RNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. *Cancer Cells* **3**: 315-319.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2256-2266.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988a). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988b). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.
- Angel, P., Smeal, T., Meek, J. und Karin, M. (1989). Jun and v-Jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.* **1**: 35-43.
- Auer H.-P. (1990). Die Beeinflussung des auf Phorboldiester reagierenden Elements im Kollagenase-Gen durch umgebende Promotorsequenzen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- 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**.
- Barber, J.R. und Verma, I. (1987). Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2201-2211.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988a). Activation of DNA binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NFkB transcription factor. *Cell* **53**: 211-217.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988b). Ikb: a specific inhibitor of the NFkB transcription factor. *Science* **242**: 540-546.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1989). A 65-kD subunit of active NF-kB is required for inhibition of NF-kB by Ikb. *Genes Dev.* **3**: 1689-1698.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**: 335-344.
- Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A. und Werb, Z. (1989). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**: 848-859.

- Berridge, M.J. und Irvine, R.F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
- Binétruy, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**: 1386-1392.
- Bohmann, D. und Tjian, R. (1989). Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: Differential activity of c- and v-Jun. *Cell* **59**: 709-717.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. und Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**: 573-584.
- Boyle, W.J., van der Geer, P. und Hunter, T. (1991b). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin layer cellulose plates. *Meth. Enzymol.* im Druck.
- Bram, R.J., Lue, N.F. und Kornberg, R.D. (1986). A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. *EMBO J.* **5**: 603-608.
- Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A. und Werb, Z. (1989). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**: 848-859.
- 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.
- Busch, S.J. und Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *TIG* **6**: 36-40.
- Buss, J.E. und Sefton, B.M. (1986). Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21^{ras}. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 116-122.
- Cherry, J.R., Johnson, T.R., Dollard, C., Shuster, J.R. und Denis, C.L. (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* **56**: 409-419.
- Chiu, R., Imagawa, M., Imbra, R.J., Bockoven, J.R. und Karin M. (1987). Multiple cis- and transacting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* **329**: 648-651.
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**: 541-552.
- Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**: 979-986.
- Ciechanover, A., DiGiuseppe, J.A., Bercovich, B., Orian, A., Richter, J.D., Schwartz, A.L. und Brodeur, G.M. (1991). Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 139-143.
- Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. und Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* **36**: 259-268.
- Curran, T., Gordon, M.B., Rubino, K.L. und Sambucetti, L.C. (1987). Isolation and characterization of the c-fos (rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* **2**: 79-84.
- Curran, T. und Franza Jr., B. R. (1988). Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**: 395-397.

- 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, P. (1989). The Structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 453-508.
- 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.
- Darbon, J.M., Oury, F., Clamens, S. und Bayard, F. (1987). TPA induces subcellular translocation and subsequent down-regulation of both phorbol ester binding and protein kinase C activities in MCF-7 Zellen. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **146**: 537-546.
- Diamond, L. (1987). Tumor promoters and cell transformation. In: *Mechanisms of Cellular Transformation by Carcinogenic Agents*, pp. 73-133, Grunberger, D, und Goff, S. (eds) Pergamon Press
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. und Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interaction: selectors of positive and negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**: 1266-1272.
- 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.
- Edelmann, A.M., Blumenthal, D.K. und Krebs, E.G. (1987). Protein Serine/Threonine Kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 567-613.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science* **240**: 889-895.
- Fantini, J., Rognoni, J.B., Roccabianca, M., Pommier, G. und Marvaldi, J. (1989). Suramin inhibits cell growth and glycolytic activity and triggers differentiation of human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D4. *J. Biol. Chem.* **264**: 10282-10286.
- Finley, D. und Vashavsky, A. (1985). The ubiquitin system: function and mechanisms. *TIBS* **10**: 343-347.
- Finkel, M.P., Biskis, B.O. und Jinkins, J.A. (1966). Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* **151**: 698-701.
- 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.
- 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.
- Ghosh, H. und Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* **344**: 678-682.
- Giniger, E., Varnum, S.M. und Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767-774.
- 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.
- Graham, R. und Gillman, M. (1991). Distinct protein targets for signals acting at the c-fos serum response element. *Science* **251**: 189-192.
- Greenberg, M.E. und Ziff, E.B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogen. *Nature* **311**: 433-438.
- Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L. und Ziff, E.B. (1986) Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1050-1057.
- Gschwendt, M., Kittstein, W. und Marks, F. (1991). Protein kinase C activation by phorbol ester: do cysteine-rich regions and pseudosubstrate motifs play a role? *TIBS* **16**: 167-169.
- Guis, D., Cao, X., Rauscher III, F. J., Cohen, D.R., Curran, T. und Sukhatme V.P. (1990). Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions: The C terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4243-4255.
- Härtig, E., Loncarevic, I.F., Büscher, M., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1991). A new cAMP response element in the transcribed region of the human c-fos gene. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4153-5159.
- 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.
- 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.
- Harris Jr., E. D., Welgus, H. G. und Krane, S. M. (1984). Regulation of the mammalian collagenases. *Coll. Rel. Res.* **4**: 493-512.
- Hecker, E. (1968). Cocarcinogenic principles from seed oil of Croton tiglium and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **28**: 2338-2349.
- Heldin, C. und Westmark, B. (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* **37**: 9-20.
- Herrera, R.E., Shaw, P.E. und Nordheim, A. (1989). Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* **340**: 68-70.
- Herrlich, P., 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., Ponta, H. und Rahmsdorf, H.J. (1991). DNA damage induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, im Druck.
- Hershko, A. (1988). Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* **263**: 15237-15240.
- Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989). Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**: 1433-1439.
- Hirai, S.-I., Bourachot, B. und Yaniv M. (1990). Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* **5**: 39-46.
- Hoeck, W., Rusconi, S. und Groner, B. (1989). Down-regulation and phosphorylation of Glucocorticoid Receptors in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 14396-14402.
- Hunter, T. und Sefton, B.S. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **77**: 1311-1315:

- Hunter, H und Cooper, J.A. (1985). Protein-Tyrosine Kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 897-930.
- Jackson, S.P. und Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**: 125-133.
- Jenuwein, T. und Müller, R. (1987) Structure-Function analysis of Fos protein: a single amino acid change activates the immortalizing potential of v-fos. *Cell* **48**: 647-657.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Anti-tumor promotion and anti-inflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-1204.
- Jonat, C., Stein, B., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1991). Positive and negative regulation of collagenase expression. In "Proceedings of the Matrix Metalloproteinase Conference". Destin, Florida, im Druck.
- Kaina, B., Stein, B., Schönthal, A., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1989). 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.
- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.
- Kerr, L.D., Holt, J.T. und Matrisan, L.M. (1988). Growth factors regulate transin gene expression by c-fos dependent and c-fos independent pathways. *Science* **242**: 1424-1427.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. und Nishizuka, Y. (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J. biol. Chem.* **258**: 11442-11445.
- Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K. und Nishizuka, Y. (1987). Identification of the structures of multiple subspecies of protein kinase C expressed in rat brain. *FEBS Lett.* **217**: 227-231.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schönthal, A., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich P. (1989). Autoregulation of fos: dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* **8**: 2559-2566.
- König, H. (1991). Cell-type specific multiprotein complex formation over the c-fos serum response element in vivo: ternary complex formation is not required for the induction of c-fos. *Nucl. Acids Res.* **19**: 3607-3611.
- Kouzarides, T. und Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* **336**: 646-651.
- Kovary, K. und Bravo R. (1991). Expression of different Jun and Fos proteins during G0-to G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2451-2459.
- Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., Loferer, H., Grunicke, H.H., Ponta, H., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1990). Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 303-313.
- Krämer, M. (1991). Das Cytokin Interleukin-1 α und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor: Zwei neue Komponenten der UV-induzierten Signalkette in Säugerzellen. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Kruijer, W., Cooper, J.S., Hunter, T. und Verma, I. (1984). Platelet-derived growth factors induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* **312**: 711-716.
- Lacal, J.C., Fleming, T.P., Warren, B.S., Blumberg, P.M. und Aaronson S.A. (1987). Involvement of functional protein kinase C in the Mitogenic response to the H-ras oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4146-4149.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. (1988). Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature* **334**: 629-631.
- 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.
- Lau, L.F. und Nathans, D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos and c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1182-1186.
- 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* **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.
- Lee, W.M.F., Lin, C. und Curran, T. (1988). Activation of the transforming potential of the human c-fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified Fos protein. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5521-5527.
- 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.
- Loferer, H. (1989) Bedeutung von Proteinkinasen bei der Transformation von NIH-3T3-Fibroblasten durch HA-RAS unter der besonderen Berücksichtigung der Proteinkinase C. Diplomarbeit, Innsbruck.
- 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., Neuberger, 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.
- Lucibello, F.C., Lowag, C., Neuberger, M. und Müller, R. (1989). Trans-repression of the mouse c-fos promoter: a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation. *Cell* **59**: 999-1007.
- Lucibello, F.C., Neuberger, M., Jenuwein, T. und Müller, R. (1991). Multiple regions of v-Fos involved in the activation of AP-1 dependent transcription: Is Trans-Activation crucial for transformation? *The New Biologist* **3**: 671-677.
- 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.
- Mahadevan, L.C., Wills, A.J., Hirst, E.A., Rathjen, P.D. und Heath, J.K. (1990) 2-Aminopurine abolishes EGF- and TPA-stimulated pp33 phosphorylation and c-fos induction without affecting the activation of protein kinase C. *Oncogen* **5**: 327-335.
- 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.
- Manak, J.R., de Bisschop, N., Kris, R.M. und Prywes, R. (1990). Casein kinase II enhances the DNA binding activity of serum response element factor. *Genes Dev.* **4**: 955-967.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

- Manne, V; Bekesi, M und Kung, H.-F. (1985). Ha-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-ras gene products result in decreased GTPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 376-380.
- Marshall, C.J. (1991) How does p21^{ras} transform cells? *TIG* **7**: 91-95.
- Matrisan, L.M., Leroy, P., Ruhlmann, C., Gesnel, M-C. und Breathnach, R. (1986). Isolation of the oncogen andepidermal growth factors-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1172-1179.
- Mitchell, P.J. und Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
- Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U.R. und Sander, T. (1984). Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature* **312**: 558-561.
- Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. und Curran T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* **312**: 716-720.
- 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. und Reynolds, J. J. (1985). Progress towards understanding the resorption of connective tissues. *BioEssays* **2**: 55-60.
- 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.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. und Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* **55**: 907-915.
- Nakabeppu, Y. und Nathans, D. (1989). The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.* **8**: 3833-3841.
- Neuberg, M., Schuermann, M., Hunter, J.B. und Müller, R. (1989). Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the FOS/JUN protein complex. *Nature* **338**: 589-590.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**: 661-665.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. und Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**: 989-1003.
- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J.L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**: 527-538.
- Ofir, R., Dwarki, V.J., Rashid, D. und Verma I.M. (1990). Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* **348**: 80-82.
- Ohno S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T. und Hidaka, H. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature* **325**: 161-166.
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. und Suzuki, K. (1988). A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell* **53**: 731-741.
- Ono, Y. und Kikkawa, U. (1987). Do multiple species of protein kinase C transduce different signals? *TIBS* **12**: 421-423.

- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. und Nishizuka, Y. (1987). Identifikation of three additional members of rat protein kinase C family: δ - ϵ - and ζ -subspecies. *FEBS Lett.* **266**: 125-128.
- Parker, P.J., Stabel, S. und Waterfield, M.D. (1984). Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain-identity with the phorbol ester receptor. *EMBO J.* **3**: 953-959.
- Payne, D.M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.-H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. und Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**: 885-892.
- Protic-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P.J., Hauser, J., Kraemer, K.H. und Dixon, K. (1986). UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3349-3356.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature (London)* **335**: 683-689.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinase. *Nature* **353**: 670-674.
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* **15**: 1643-1659.
- Rahmsdorf H.J. und Herrlich, P. (1990). Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmac. Ther.* **48**: 157-188.
- 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.
- Rapp, U.R. (1991). Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene* **6**: 495-500.
- Rauscher III, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. und Franza Jr., B. R. (1988a). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**: 1010-1016.
- Rauscher III, F. J., Voulalas, P. J., Franza Jr., B. R. und Curran, T. (1988b). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* **2**: 1687-1699.
- Ray, L.B., und Sturgill T.W. (1988) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3753-3757.
- Raychaudhuri, P., Bagchi, S. und Nevins, J.R. (1989). DNA-binding activity of the adenovirus-induced E4F transcription factor is regulated by phosphorylation. *Genes Dev.* **3**: 620-627.
- Rechsteiner, M. (1991). Natural substrat of the Ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* **66**: 615-618.
- Robbins, P.D., Horowitz, J.M. und Mulligan, R. (1991). Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* **346**: 668-671.
- Rozengurt, E. (1986). Early signals in the mitogenic response. *Science* **234**: 161-166.
- Rütger, U., Wagner, E.F. und Müller, R. (1985). Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **4**: 1775-1781
- Ryan JR, W.A., Franza JR, B.R. und Gilman, M.Z. (1989). Two distinct cellular phosphoproteins binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* **8**: 1785-1792.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuérne, E. und Nathans, D. (1989). Jun-D: A third member of the jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1500-1503.
- 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. (1988a). Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* **54**: 553-560.

- Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W. und Verma, I.M. (1988b). Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the "leucine zipper" domain. *Nature* **336**, 692-695.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C. und Verma, I.M. (1988c). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogen fos. *Nature* **334**: 314-319.
- Shaw, P.E., Schröter, H. und Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* **56**: 563-572.
- 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- α and interferon- γ on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* **181**: 409-419.
- Scheidtmann, K.H., Echele, B. und Walter, G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Vir.* **44**: 116-133.
- Schimke, R. T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* **37**: 705-713.
- Schmitz, M.L. und Baeuerle P. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF κ B. *EMBO J.* **10**: 3805-3817.
- Schönthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1988a). Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **53**: 779-787.
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. und Ponta, H. (1988b). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* **54**: 325-334.
- Schönthal, A., Büscher M., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. und Herrlich, P. (1989). The Fos and Jun/AP-1 protein are involved in the downregulation of fos transcription. *Oncogene* **4**: 629-636.
- 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.
- Schuermann, M., Neuberger, M., Hunter, J.B., Jenuwein, T., Ryseck, R.-P. und Müller, R. (1989). The leucine zipper motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP1 and is required for transformation. *Cell* **56**: 507-516.
- Scibner, N.K. und Scibner J.D. (1980). Separation of initiation and promoting effects of skin carcinogen 7-bromomethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis* **1**: 97-100.
- Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *TIG* **1**: 224-230.
- Shirakawa, F. und Mizel, S.B. (1989). In vitro activation and nuclear translocation of NF κ B catalysed by cyclic AMP dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2424-2430.
- Slaga, T.J., Fischer, S.M., Nelson, K. und Gleason, G.L. (1980). Studies on the mechanisms of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 3659-3663.
- 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. (1989). 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., 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, Tbe Woodlands, Texas, 7: 37-43.
- Stein, B. (1990). Mechanismus der UV-induzierten Expression des menschlichen Immunschwäche-Virus Typ I, der Collagenase und des Protoonkogens c-jun. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H.J. (1991) UV induced c-jun gene transcription: Two AP-1 like binding sites acting additively mediate the response. *Photochem. Photobiol.* in press
- Stricklin, G. P. und Welgus, H. G. (1983). Human skin fibroblasts collagenase inhibitors. Purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **258**: 12252-12258.
- Tapley, P.M. und Murray, A.W. (1984). Modulation of Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase in platelets treated with tumor-promoting phorbol ester. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **122**: 158-164.
- Touray, M., Ryan, F., Jaggi, R. und Martin, F. (1991). Characterisation of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* **6**: 1127-1234.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serumfactors. *Cell* **46**: 567-574.
- Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* **6**: 2711-2717.
- Turner, R. und Tjian, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**: 1689-1694.
- van Dam, H.R., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A.M., Herrlich, P., Bos, J.L. und van der Eb, A. (1990). Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5857-5864.
- van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. und Verma, I. M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell* **32**: 1241-1255.
- van Beveren, C., Enami, S., Curran, T. und Verma, I.M. (1984). FBR murine osteosarcoma virus, II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome acquired from two cellular genes. *Virology* **135**: 229-234.
- Wasylyk, C., Flores, P., Gutman, A. und Wasylyk, B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non nuclear oncogenes. *EMBO J.* **8**: 3371-3378.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Bague, A., LePunce, P. und Stehelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogen encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**: 191-193.
- Webster, N., Jia, R.L., Green, S., Hollis, M. und Chambon, P. (1988). The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**: 169-178.
- Webster, N., Green, S., Tasset, D., Ponglikitmongol, M. und Chambon, P. (1989). The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded in a single exon. *EMBO J.* **8**: 1441-1446.
- Wilson, T. und Treisman, R. (1988). Fos C-terminal mutations block down-regulation of c-fos transcription following serum stimulation. *EMBO J.* **7**: 4193-4202.
- Wolfman, A. und Macara, I.G. (1987). Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblats. *Nature* **325**: 359-361.
- Woolley, D. E. (1984). Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **3**: 361-372.
- 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* **334**: 494-498.

- Yang-Yen, H.-F., Chiu, R. und Karin, M. (1990a). Elevation of AP-1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol.* **2**: 351-361.
- Yang-Yen, F.H., Chambord, J.C., Sun Y.L., Smeal, T., Schmidt T.J., Drouin, J. und Karin, M. (1990b). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**:1205-1215.
- Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990a). Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: Reversal by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5346-5350.
- Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990b). Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer and Metastasis Rev.* **9**: 191-202.
- 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.
- Zölner, 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.