



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5886 B

**Spezifische Signaltrans-
duktionswege, über die das
E1A-Onkoprotein und
alkylierende Substanzen die
Expression zellulärer Gene
modulieren**

I. D. Wilhelm
Institut für Genetik

März 1997

FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5886 B

**Spezifische Signaltransduktionswege, über die das
E1A-Onkoprotein und alkylierende Substanzen die
Expression zellulärer Gene modulieren**

**Ingrid Dagmar Wilhelm
Institut für Genetik**

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1997

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

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

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Das Verständnis für das regulatorische Netzwerk in Zellen, wie extrazelluläre Signale an der Zellmembran in Veränderungen in der Expression spezifischer Gene im Zellkern umgesetzt werden, ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis komplexer biologischer Vorgänge wie Zellwachstum und Differenzierung. Zahlreiche Produkte zellulärer Proto-Onkogene sind Bestandteile der Signalketten zur Weiterleitung von inter- und intrazellulärer Information. Eine Störung dieser Regulation führt zur Zelltransformation und Tumorgenese. Sie kann durch die Überexpression oder Mutation von Onkogenen ausgelöst werden.

Strahlung und chemische Mutagene, wie alkylierende Agenzien, Tumorpromotoren (z.B. der Phorbolster TPA) und die Expression von Onkoproteinen (z.B. das E1A-Protein des Adenovirus) können alleine oder gemeinsam die Transformation von Zellen bewirken. Ein gemeinsames Charakteristikum der zellulären Antwort, die diese Stimuli auslösen, ist die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun*-Proto-Onkogens. Sie wird vermittelt durch die Phosphorylierung von cJun/ATF-2-Heterodimere, bzw. ATF-2-Homodimere, welche ständig am *c-jun*-Promotor gebunden vorliegen. Obwohl diese Induktoren unterschiedliche Primäreffekte in der Zelle haben, führen sie über Signaltransduktionwege zu einem gemeinsamen Endpunkt: Die Steigerung der Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich ein gemeinsames Konzept der zellulären Antwort definieren, das sowohl durch die alkylierende Substanz MMS als auch das E1A-Onkoprotein des menschlichen Adenovirus ausgelöst wird. Diese spezifische zelluläre Streßantwort beinhaltet die Aktivierung von JNK/SAPKs, p38-MAP-Kinase und ihren "stromaufwärts" gelegenen Aktivator SEK1/MKK4. Im Gegensatz zu MMS scheint E1A jedoch allein nicht auszureichen, um JNK/SAPKs zu aktivieren. Dazu ist ein zweites Signal bzw. die Stimulation einer weiteren Signalkette notwendig, die durch die Behandlung der Zellen mit Cadmium induziert werden kann.

Die Induktion dieser Streßantwort durch Alkylanzien ist abhängig von der elektrophilen Aktivität der verwendeten Substanz. Weder der DNA-Schaden, der durch die Alkylierung verursacht wurde, noch die Aktivierung von Zelloberflächen-Rezeptoren, wie es für UV-Strahlung nachgewiesen werden konnte, ist für die Induktion dieser Signalwege

verantwortlich. Ein kritischer Parameter ist jedoch der intrazelluläre Glutathionspiegel. Eine Erhöhung des Glutathiongehaltes führt zu einer Hemmung der MMS-Antwort. Umgekehrt hat die Depletion des zellulären Glutathions eine Potenzierung der JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS zur Folge. Dieser Einfluß des Glutathions kann auf einer direkten Inaktivierung des MMS oder auf der Beeinflussung einer Komponente des Signalweges, die sensitiv gegenüber Veränderungen des Redoxpotentials der Zelle ist, beruhen.

Durch die JNK/SAPK-abhängige transkriptionelle Stimulation der *c-jun* und *c-fos* Expression wird die Transkription von AP-1-abhängigen Genen, die für Xenobiotika-metabolisierende Enzyme kodieren, induziert. Dadurch wird indirekt auch der intrazelluläre Glutathionspiegel angehoben, was mit der erworbenen Resistenz von Zellen gegenüber alkylierenden Substanzen korreliert. Damit scheinen JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase eine entscheidende Rolle bei der Induktion von zellulären Schutzmechanismen gegenüber zytotoxischen Xenobiotika zu spielen.

Specific signal transduction pathways via the E1A oncoprotein and alkylating agents modulate the expression of cellular genes

Abstract. The knowledge of the regulatory network of cells, i.e. how extracellular signals at the cell membrane are transformed into changes in the expression of specific genes in the nucleus, is the main prerequisite for the understanding of complex biological processes such as cell growth and differentiation. Many products of cellular proto-oncogenes have been identified to be members of signal transduction pathways which transmit inter- and intracellular informations. Deregulation caused by e.g. overexpression or mutation of oncogenes leads to cell transformation and tumorigenicity.

Radiation and chemical mutagens such as alkylating agents, tumor promoters (e.g. TPA) and the expression of oncoproteins (e.g. adenoviral E1A protein) alone or in combination can effect the rate of cell transformation. A common characteristic of the cellular response to these stimuli is the transcriptional activation of the *c-jun* protooncogene. This activation is mediated by the phosphorylation of cJun/ATF-2-homodimers or ATF-2-heterodimers, which are constantly bound to the *c-jun*-promoter. Despite the fact, that these stimuli have different primary targets in the cells, via distinct signal transduction pathways they target a common end-point: the enhanced phosphorylation of these transcription factors.

In this PhD-thesis I was able to define a common concept of the cellular stress response, that is induced by both the alkylating agent MMS and the E1A oncoprotein of the human adenovirus. This specific response includes the activation of JNK/SAPKs, p38-MAP kinase and their upstream activator SEK1/MKK4. However, in contrast to MMS, E1A alone seems not to be sufficient for the activation of JNK/SAPKs. It requires a second signal or the stimulation of another signal transduction pathway, which can be induced by the treatment of cells with heavy metal such as cadmium.

The stress response induced by alkylating agents depends on the electrophilic activity of the utilized substance. Neither the DNA damage caused by the alkylation nor the activation of cell surface receptors, which are critically involved in the UV-response, are responsible for the induction of this signal transduction pathway. The intracellular level of glutathion is a critical parameter. An increase in the content of glutathion almost completely diminished causes the MMS response; and vice versa, depletion of the cellular glutathione, results in

the potentiation of the JNK/SAPK activation. The effect of the glutathione may be explained by either direct inactivation of MMS or by modulation of components of the signal transduction pathway, which are sensitive against changes of the cellular redox state. The JNK/SAPK-dependent transcriptional activation of *c-jun* and *c-fos* eventually results in the induction of the expression of AP-1-dependent genes encoding xenobiotica-metabolizing enzymes such as glutathione-S-transferase. Indirectly this causes an increase in the intracellular glutathion level, which correlates with the aquired resistance against alkylating agents. Therefore signal transduction pathways that involve activation of JNK/SAPKs seem to play a major role in the induction of cellular protection mechanisms against cytotoxic xenobiotica.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Einleitung	3
Material	17
Methoden	25
<u>1. Zellkultur</u>	25
Passagieren von Zellen	
Einfrieren und Auftauen von Zellen	
Behandlung von Zellen mit Induktoren	
Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen	
Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵ S -Methionin	
Präparation von Zellen ohne Kern (Zytoplasten)	
<u>2. Analyse von Nukleinsäuren</u>	28
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
Phenol/Chloroform-Extraktion	
Fällung von Nukleinsäuren	
<u>3. DNA-Methoden</u>	29
3.1 DNA-Präparation.....	29
Plasmid-DNA Mini-Präparation	
Plasmid-DNA Maxi-Präparation	
3.2 Klonierungstechniken.....	31
Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	
Dephosphorylierung von DNA	
Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern	
Auffüllen von 5'-Überhängen	
Ligation von DNA-Fragmenten	
Polymerase-Ketten-Reaktion	
Sequenzierung von DNA	
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	
Transformation kompetenter Bakterien	
3.3 DNA-Gelelektrophorese.....	34
Agarose-Gelelektrophorese	
Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	

<u>4. RNA-Methoden</u>	36
Präparation von Gesamt-RNA	
RNase Protektionsanalyse	
<u>5. Protein-Methoden</u>	37
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	
Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen	
Immunoblot-Analyse von Proteinen ("Western Blot")	
Immunpräzipitation von Proteinen	
Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität ("CAT-Assay")	
Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen	
Herstellung der Na ₃ VO ₄ -Stammlösung	
In-Gel-Kinase-Assay	
Reinigung der cJun- bzw. ATF-2-assozierten Kinasen	
Immunkomplex-Kinase-Assay	
Ergebnisse	47
<u>Teil I: E1A-induzierte Signaltransduktion</u>	47
Endogenes cJun wird durch TPA und E1A induziert	
E1A aktiviert JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase	
E1A-Expression aktiviert SEK1	
Klonierung von Östrogen-induzierbarer E1A-Expressionsvektoren	
ER-Fusionsproteine reprimieren die TPA-Induktion der Kollagenase	
Stabile Transfektion der E1A-ER-Konstrukte	
In den Zellklonen G6ER und F16ER läßt sich keine Östrogen-abhängige	
JNK/SAPK-Aktivierung feststellen	
<u>Teil II: MMS-induzierte Signaltransduktion</u>	69
MMS aktiviert JNK/SAPKs	
JNK/SAPKs phosphorylieren ebenfalls ATF-2	
Die JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS ist konzentrationsabhängig	
JNK/SAPKs werden nur von bestimmten alkylierenden Substanzen aktiviert	
MMS induziert Proteinkinasen-Kaskaden	
Die MMS-Antwort ist unabhängig von Signalen aus dem Kern	
An der MMS-Antwort sind keine Zelloberflächen-Rezeptoren beteiligt	
Die MMS-Antwort wird durch Glutathion und N-Acetylcystein gehemmt	
Diskussion	91
Literatur	107

Abkürzungen

µg	Mikrogramm	ENU	Ethylnitrosoharnstoff
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)	ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ Molar)	et al.	und andere ("et alii")
ABA	3-Aminobenzamid	f.c.	Endkonzentration ("final concentration")
Abb	Abbildung	FCS	fötales Kälberserum
AP-1	Aktivator-Protein-1	g	Gramm oder Erdbeschleunigung
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GCK	"germinal center kinase"
AS	Aminosäure(n)	GR	"growth factor receptor"
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor	GSH	Glutathion
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	GST	Glutathion-S-Transferase
βARK	β-adrenerge Rezeptor Kinase	h	Stunde
bp	Basenpaar	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Bq	Bequerel	hsp	Hitzeschock-Protein
BSA	Rinder Serumalbumin ("bovine serum albumine")	IL-1β	Interleukin-1β
BSO	Butioninsulfoximid	J	Joule
Bsp.	Beispiel	JNK	Jun-N-terminale Kinase
bzw.	beziehungsweise	kb	Kilobasen
c	zellulär ("cellular")	kD	Kilodalton
C-Terminus	Carboxyterminus	l	Liter
CAT	Chloramphenicol-Transferase	LPA	"lysophosphatidic acid"
Ci	Curie	m	Meter
cm	Zentimeter	M	molar
cpm	"counts per minute"	mA	Milliampere
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid	MAPK	"mitogen activated protein kinase"
d.h.	das heißt	MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat	MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
DC	Dünnschichtchromatographie	MBq	Megabequerel
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat	MEK	MAPK/ERK-Kinase
DEAE	Diethylaminoethyl	MEKK	MEK Kinase
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagles's Medium"	min	Minute
DMS	Dimethylsulfonat	MKK	MAP Kinase Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid	MLK	"mixed lineage kinase"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ml	Milliliter
DNase	Desoxyribonuklease	mM	Millimolar
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate	MMS	Methylmethansulfonat
DTT	Dithiothreitol	MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat	MNU	"methylnitrosourea"
E.coli	Escherichia coli	MOPS	3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure
ECL	"enhanced chemoluminescence"		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor		
EMS	Ethylmethylsulfonat		

mRNA	"messenger RNA "	V		Volt
MUK	"MAPK-upstream kinase"	vgl.		vergleiche
		Vol.		Volumen
NAC	N-Acetylcystein			
NAD	Nicotinamidadeninnucleotid	W		Watt
NaDOC	Natriumdeoxycholat			
ng	Nanogramm	z.B.		zum Beispiel
nm	Nanometer	z.T.		zum Teil
°C	Grad Celsius			
OD	optische Dichte			
p.a.	Analyse-rein			
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese			
PAK	"p21-activated protein kinase"			
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase	Ein- und	Dreibuchstabencode	für
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Aminosäuren		
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion	A	Ala	Alanin
PDGF	"platelet derived growth factor"	C	Cys	Cystein
pH	pH-Wert	D	Asp	Aspartat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	E	Glu	Glutamat
		F	Phe	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase C	G	Gly	Glycin
pmol	Picomol	H	His	Histidin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	I	Iso	Isoleuzin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid	K	Lys	Lysin
		L	Leu	Leuzin
RNA	Ribonukleinsäure	M	Met	Methionin
RNase	Ribonuklease	N	Asn	Asparagin
RT	Raumtemperatur	P	Pro	Prolin
		Q	Gln	Glutamin
s	Sekunde	R	Arg	Arginin
SAPK	"stress-activated protein kinase"	S	Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat	T	Thr	Threonin
SH	Src-Homologie	V	Val	Valin
SPRK	"SH3 domain-containing proline-rich kinase"	W	Trp	Tryptophan
		Y	Tyr	Tyrosin
SSC	"standard saline citrat"			
SV40	Simian Virus 40			
TAD	Transaktivierungsdomäne			
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung			
TCA	Trichloressigsäure			
TCF	"ternary complex factor"			
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin			
TNF α	Tumornekrosefaktor α			
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat			
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan			
tRNA	Transfer-RNA			
U	Enzymeinheit ("unit")			
UpM	Umdrehungen pro Minute			
ÜS	Überstand			
UV	ultraviolette Strahlung			
v	viral			

Einleitung

In der Statistik der Todesursachen ist Krebs in diesem Jahrhundert von der siebten auf die zweite Stelle vorgerückt. Allein in Deutschland betrug 1995 der Prozentsatz an Krebstoden 24,1% (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Die Entstehung eines Tumors ist ein mehrstufiger Prozeß. Er wird ausgelöst durch die Transformation, d.h. die Entartung einer einzelnen, normalen Zelle, die dadurch der Wachstums- und Differenzierungskontrolle des Körpers entgeht. Als letzte Stufe gilt die Auswanderung von Zellen vom Primärtumor und deren Absiedelung in anderen Organen.

Die exakte Kontrolle und Koordination von komplexen, physiologischen Vorgängen wie Wachstum und Differenzierung in multizellulären Organismen setzt die räumlich und zeitlich differenzierte Regulation der Expression spezifischer Gene voraus. Wird diese Regulation gestört, kann es zur Entstehung eines Tumors kommen. Viele verschiedene Faktoren können die Genexpression beeinflussen. Diese Einflüsse kommen vor allem von außerhalb der Zelle, z.B. extrazellulären Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone, aber auch von potentiell schädigenden Einwirkungen, wie physikalische und chemische Tumorpromotoren und Karzinogene. Ausgehend von der Bindung an ihren spezifischen Rezeptor oder Veränderung ihres primären Angriffspunktes in der Zelle, wirken sie über eine Signalkaskade auf die Aktivität von nukleären Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine wiederum aktivieren oder reprimieren die Transkription spezifischer Zielgene. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren kann über deren Transkriptionsrate, posttranslationale Modifikationen oder über Protein/Protein-Wechselwirkungen reguliert werden. Das Eingreifen in diesen fein regulierten Mechanismus durch die verschiedenen Klassen krebsauslösender Stimuli, wie der UV-Strahlung, chemischer Karzinogene, z.B. alkylierender Substanzen wie *Methylmethansulfonat* (MMS), der Tumorpromotoren, z.B. des Phorbolesters TPA (12-O-*Tetradecanoyl-phorbol-13-Azetat*) und der Expression von Onkoproteinen, wie das E1A des menschlichen Adenovirus, wird als Ursache für die Transformation von Zellen angesehen.

Bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung aber auch bei der Transformation und Karzinogenese spielt das Produkt des Proto-Onkogens *c-jun* eine zentrale Rolle. Transfektionsexperimente mit primären oder immortalisierten Zelllinien ergaben, daß die

Überexpression von cJun Zelltransformation auslösen kann. Umgekehrt stoppt die Hemmung der cJun-Synthese oder -Aktivität das Zellwachstum. Auch bei der Transformation von Zellen durch das Onkoprotein E1A könnte cJun eine wichtige Rolle spielen. So reicht im "klassischen" Zelltransformations-Test zum Nachweis der Kooperation von Onkogenen die Überexpression von cJun und Ras aus, um den kooperativen Effekt von Ras und E1A zu erhalten. In Übereinstimmung mit der Annahme einer wichtigen Funktion von cJun für E1A-abhängige Prozesse, bewirkt E1A die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun*-Gens selbst.

Die Aktivierung des *c-jun*-Gens ist auch ein Charakteristikum der Behandlung von Zellen mit der alkylierenden Substanz MMS. Die verstärkte cJun-Produktion scheint einen Einfluß auf das Überleben der Zellen nach dieser Behandlung zu haben: Zellen, bei denen das *c-jun*-Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde, zeigen eine Hypersensitivität gegenüber MMS (A. Kolbus, DKFZ Heidelberg, pers. Mitteilung).

Über die Mechanismen, wie so unterschiedliche Stimuli denselben Effekt - die Aktivierung des *c-jun*-Gens - auslösen können, ist nichts bekannt.

Alkylierende Substanzen

Alkylierende Substanzen sind weit verbreitete mutagene und karzinogene Umweltfaktoren (Peto *et al.*, 1985). Aufgrund ihrer starken zytotoxischen Wirkung werden sie aber auch in der Tumorthherapie eingesetzt (Mitchell und Schein, 1992; Clamon, 1992). Sie verursachen die unterschiedlichsten Formen zellulären Stresses: Punktmutationen, Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche bis hin zum Zelltod. Als elektrophile Substanzen reagieren sie mit reaktiven Molekülen in Nukleinsäuren und Proteinen und übertragen in einer nukleophilen Substitution ihre Alkylgruppe. Es sind mehr als ein Dutzend verschiedener Reaktionsprodukte allein der DNA mit experimentell eingesetzten Alkylanzien (MNNG, MMS, MNU, EMS, DMS, usw.) bekannt (Singer, 1975; Beranek, 1990). Die relative Menge der verschiedenen Alkylprodukte variiert mit der verwendeten Substanz und ist im wesentlichen durch deren elektrophile Aktivität bestimmt (Singer und Grunberger, 1983; Beranek, 1990). Obwohl die Relevanz dieser Schäden noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte die biologische Bedeutung einzelner Reaktionsprodukte der DNA aufgezeigt werden: So wurde nachgewiesen, daß O⁶-Alkylguanin bei der mutagenen und damit karzinogenen Wirkung alkylierender Agenzien ursächlich beteiligt

ist (Loveless, 1969; Ishizaki *et al.*, 1986; Kataoka *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1991; von Hofe *et al.*, 1992). Die mutagene Wirkung beruht auf der Fehlpaarung des O⁶-Alkylguanins mit Thymin während der DNA-Replikation, was eine GC → AT Transition zur Folge hat (Singer, 1985). Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, daß MMS und MNNG, die vor allem mit dem Ringstickstoff von Purinbasen reagieren (Beranek *et al.*, 1980) und nur etwa 0.3% ihrer gesamten Alkylprodukte O⁶-Methylguanine sind, sehr effizient Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und Zelltod induzieren. Im Gegensatz dazu ist ENU ("*e*thyl*n*itrosourea"), bei dem bis zu 9% aller Alkylierungsprodukte der DNA O⁶-Ethylguanine sind, die monofunktionale, alkylierende Substanz mit der größten Mutagenität und Karzinogenität.

Zahlreiche Untersuchungen der vergangenen Jahre befaßten sich mit den Ursachen der karzinogenen Wirkung von Alkylanzien (zur Übersicht siehe: Wogan, 1975; Mirvish, 1975; Fiddler, 1975; Lawley, 1984; Kaina, 1993). Ein wesentlicher Faktor hierbei ist die Einführung von Punktmutationen durch induzierte Basenaustausche nach Einwirkung alkylierender Agenzien (Sukumar *et al.*, 1983). So wurde die Aktivierung des Proto-Onkogens c-Ha-ras durch die direkte Einführung einer O⁶-Methylguanin-Base in die DNA beschrieben (Mitra *et al.*, 1989; Kamiya *et al.*, 1991; Pletsa *et al.*, 1992). Andererseits induzieren alkylierende Substanzen die Expression von Genen, wie z.B. *c-jun* oder Glutathion-S-Transferase (Bergelson *et al.*, 1994; van Dam *et al.*, 1995). Über den Mechanismus dieser Induktion ist noch nichts bekannt, sie scheint jedoch über AP-1-Bindestellen in den Promotoren zu wirken (Bergelson *et al.*, 1994; van Dam *et al.*, 1995). Ob dabei allerdings der DNA-Schaden oder z.B. die Alkylierung von Proteinen, die bis jetzt kaum untersucht worden ist, eine Rolle spielt, ist völlig unklar.

Das E1A-Onkoprotein des Adenovirus

Zur Klasse der krebsauslösenden Stimuli wird auch das E1A-Onkoprotein des menschlichen Adenovirus gezählt. Bei der Untersuchung molekularbiologischer Prozesse in Säugetierzellen, wie z.B. DNA-Replikation, Regulation der Genexpression, Kontrolle der Zellproliferation und deren Veränderungen bei der neoplastischen Transformation, erwies sich die Verwendung von menschlichen Adenoviren als experimentelles Modell als sehr nützlich.

Der normale Infektionszyklus von Adenoviren in menschlichen Zellen beinhaltet die Expression des gesamten genetischen Programms des Virus. Er beginnt mit der frühen Region 1 ("early region 1" = E1) und endet mit der Produktion neuer Viren und dem Tod der Wirtszelle. Die Infektion verursacht meist leichtere Beschwerden des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes (zur Übersicht siehe: Horwitz, 1990).

Im Gegensatz dazu wird bei der Infektion von nicht-permissiven Nagerzellen nur ein Teil des viralen Genoms exprimiert, so daß es nicht zur Produktion neuer Viruspartikel kommt. Jedoch wird das genetische Programm der Zelle so verändert, daß die Zelle einen transformierten Phänotyp annimmt (zur Übersicht siehe: Branton *et al.*, 1985). Zellen, die durch unterschiedliche, jedoch nah verwandte Adenovirus-Serotypen transformiert wurden, unterscheiden sich in ihrem Potential in immunkompetenten Tieren Tumoren auszulösen, d.h. in ihrer Onkogenität. Man gliedert sie in drei Untergruppen: Hoch onkogene Viren (Adenovirus Serotyp 12, 18, 31), schwach onkogene Viren (z.B. Serotyp 3 und 7) und nicht onkogene Viren (z.B. Serotyp 2 und 5) (Wadell, 1984). Damit liefern Adenovirus-transformierte Zellen die Möglichkeit Transformation und Onkogenität getrennt zu untersuchen.

Verantwortlich für die Transformation der Zellen ist die Region E1, die aus den beiden Genen E1A und E1B besteht. Zur Immortalisierung begrenzt lebensfähiger Primärzellen ist E1A ausreichend, wobei zur Vermittlung des vollständig transformierten Phänotyps mindestens ein weiteres Onkogen (z.B. E1B, ras, src, erbB) nötig ist (Houweling *et al.*, 1980, Bernards *et al.*, 1992; Land *et al.*, 1983; Ruley, 1983). E1B selbst hat keine transformierende Kapazität (van den Elsen *et al.*, 1983). In Adenovirus-transformierten Zellen wird E1A in zwei unterschiedlich gespleißte mRNAs transkribiert: die 12S- und 13S-Form. Die von ihnen kodierten Proteine - im Falle des Adenovirus Serotyps 5 243 und 289 Aminosäuren lang - unterscheiden sich nur durch einen internen, 46 Aminosäurenlangen Bereich, der ausschließlich im 13S-Genprodukt enthalten ist (Abb. 1; Perricaudet *et al.*, 1979; zur Übersicht siehe: van der Eb und Zantema, 1992). In E1A exprimierenden Zellen können im allgemeinen multiple Formen beider Proteine detektiert werden, was auf zahlreiche posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist (Harlow *et al.*, 1985).

Beim Sequenzvergleich verschiedener Adenovirus-Serotypen wurden drei konservierte Regionen (CR1-3) gefunden (Abb. 1). Die transformierende Kapazität wird von CR1, CR2 und einer Region am extremen N-Terminus vermittelt. Die dritte konservierte Region,

CR3, welche nur im 13S-Genprodukt enthalten ist, ist zur Transformation nicht notwendig (Lillie *et al.*, 1986; Moran *et al.*, 1986; Schneider *et al.*, 1987). Sie bewirkt aber die Transaktivierung einer Reihe viraler und zellulärer Promotoren, was essentiell für die Produktion neuer Virus-Partikel in permissiven Zellen ist.

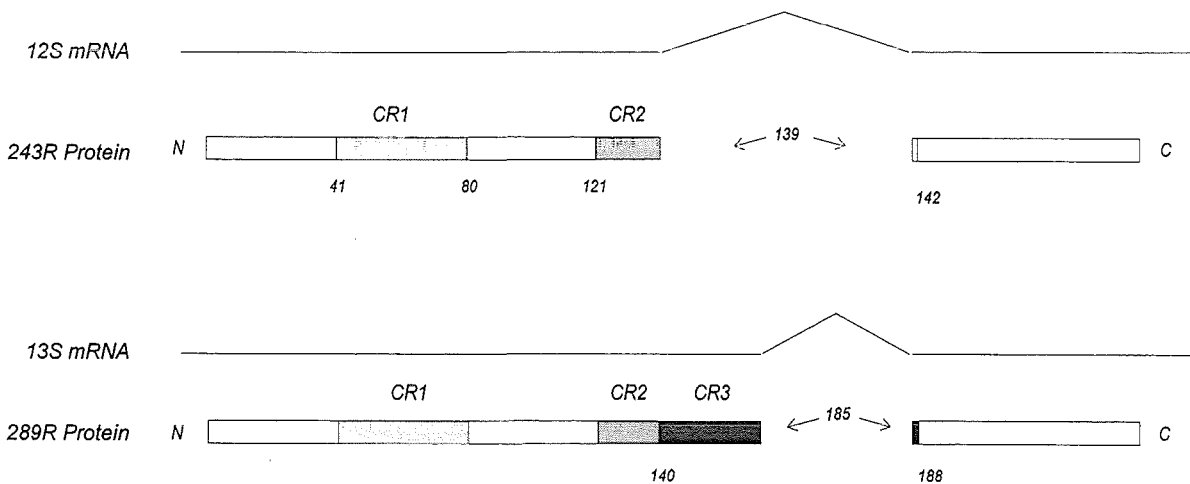


Abb.1: Schematische Darstellung der Adenovirus-Serotyp 5-E1A mRNAs und Proteine.

Markiert sind die konservierten Regionen CR1-3. Die Zahlen geben jeweils die erste und letzte Aminosäure jeder konservierten Region an und die Aminosäuren an denen der Spleißvorgang stattgefunden hat.

Der Einfluß von CR1, CR2 und dem N-Terminus, den Domänen, die für die Transformation verantwortlich sind, beruht hauptsächlich auf der Veränderung der Expression zellulärer Gene. Diese Regionen assoziieren mit einer Anzahl zellulärer Proteine, von denen die meisten Schlüsselrollen in der Regulation des Zellzyklus spielen, z.B. pRb, p107, p130, p300, Cyclin E und A und Cdk2 (zur Übersicht siehe: Dyson und Harlow, 1992). Abgesehen von p300 regulieren diese Proteine die Aktivität des E2F-Transkriptionsfaktors (Bagchi *et al.*, 1990; Bandara und La Thangue, 1991; Chellappan *et al.*, 1991; Chittenden *et al.*, 1991), so daß E1A durch Bindung an diese Proteine die E2F-abhängige Transkription moduliert (Devoto *et al.*, 1992; Shirodkar *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 1992; Cobrinik *et al.*, 1993). Der aktivierte E2F-Transkriptionsfaktor stimuliert die Expression von Genen, die für die S-Phase des Zellzyklusses notwendig sind.

Allerdings verändert E1A auch E2F-unabhängige Genexpression. Bei den meisten dieser Gene scheint E1A über den Transkriptionsfaktor AP-1 zu wirken (van Dam *et al.*, 1990). Auf der einen Seite werden bestimmte Gene, wie z.B. das *c-jun*-Gen, induziert (van Dam *et al.*, 1990; deGroot *et al.*, 1991; Kitabayashi *et al.*, 1991), auf der anderen Seite findet man eine Repression der Expression zellulärer Gene, z.B. Matrix-abbauender Metalloproteinasen wie der Kollagenase und Stromelysin (Offringa *et al.*, 1990) oder von Oberflächenmolekülen wie CD44 (Hofmann *et al.*, 1993). Beide Funktionen werden über den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt.

Der Transkriptionsfaktor AP-1

AP-1 (*aktivierendes Protein-1*) ist ein Beispiel für einen transaktivierenden Faktor, der sowohl in die Regulation der Zellproliferation als auch bei der Transformation involviert ist (Lee *et al.*, 1987a, b; Angel *et al.*, 1987b). AP-1 ist ein Sammelbegriff für Homodimere aus Proteinen der Proto-Onkogenfamilien *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*) und ATF/CREB (ATF-2, ATF-a) und Heterodimere aus Proteinen der *jun*-Genfamilie assoziiert mit Proteinen der ATF/CREB- und *fos*- (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*)-Proto-Onkogenfamilie (Bohmann *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1988a; Bos *et al.*, 1988; Hirai *et al.*, 1989; Ryder *et al.*, 1989; Rauscher *et al.*, 1988a, b; Zerial *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Matsui und DeLeo, 1990; Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991).

Die Mitglieder dieser Genfamilien zeichnen sich durch eine stark konservierte Region von etwa 60 Aminosäuren, die sogenannte bZIP-Region aus (Landschulz *et al.*, 1988). Sie beinhaltet zwei funktionale Proteindomänen: eine basische Region und die Dimerisierungsdomäne, den sogenannten Leuzin-Zipper (Landschulz *et al.*, 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Gentz *et al.*, 1989; Turner und Tjian, 1989; Neuberger *et al.*, 1989). Die basische Region ist charakterisiert durch eine Ansammlung von 12-14 basischen Aminosäuren, die für die sequenzspezifische DNA-Bindung, basierend auf ionischen Wechselwirkungen, verantwortlich sind (Vogt und Bos, 1990). Die Dimerisierungsdomäne besitzt eine α -helikale Struktur. Die Dimerisierung selbst beruht auf einem Netzwerk ionischer und hydrophober Wechselwirkungen zwischen den exponierten Proteinoberflächen (Schuermann *et al.*, 1991; O'Shea *et al.*, 1992; Glover und Harrison, 1995), sogenannte "coiled-coil" Wechselwirkungen bei paralleler Orientierung. Diese Wechselwirkungen sind auch dafür verantwortlich, daß Proteine der *fos*-Genfamilie

aufgrund elektrostatischer Abstoßungskräfte keine Homodimere bilden können (Nakabeppu *et al.*, 1988; Kouzarides und Ziff, 1988; Angel und Karin, 1991).

Die Zusammensetzung der verschiedenen AP-1 Komplexe bestimmt ihre Stabilität und ihre Affinität für verschiedene Bindestellen (Ryseck und Bravo, 1991). Als Konsensus-Sequenz, an die AP-1-Komplexe binden und damit die Transkription der Zielgene verändern, wurde das sogenannte TRE ("TPA-responsive element") 5'-T^T/G^GA^G/C^CTCA-3' beschrieben (Angel *et al.*, 1987a, b). Bis jetzt sind eine Vielzahl verschiedener Gene mit funktionellen TREs in ihren Promotorsequenzen charakterisiert worden (Busslinger und Bergers, 1994). Sie kodieren unter anderem für Wachstumsfaktoren (z.B. NGF, Hengeler *et al.*, 1990), Metalloproteinasen (z.B. Kollagenase, Angel *et al.*, 1987b; Stromelysin, Kerr *et al.* 1988; Urokinase, Nerlov *et al.*, 1991), Transkriptionsfaktoren (z.B. Fra-1, Bergers *et al.*, 1995) und Zelltyp-spezifische Genprodukte (z.B. Osteocalcin, Schüle *et al.*, 1990a). Eine zweite, AP-1-ähnliche Konsensussequenz besitzt ein zusätzliches Basenpaar im Zentrum. Zwei dieser Erkennungssequenzen befinden sich im Promotor des *c-jun*-Gens, *jun1* (5'-TGACATCA-3') und *jun2* (5'-TTACCTCA-3'). An diese binden vor allem cJun/ATF-2-Heterodimere und ATF-2-Homodimere (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991; van Dam *et al.*, 1993; Chatton *et al.*, 1994; Herr *et al.*, 1994).

Eine dritte, funktionale Proteindomäne ist die Transaktivierungsdomäne (TAD). Diese Domäne stellt den direkten oder indirekten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie her und gewährleistet damit die effiziente Initiation der Transkription. Im Falle des cJun-Proteins wird die Interaktion durch einen (oder mehrere) Kofaktoren vermittelt (Oehler und Angel, 1992). Die TADs befinden sich beim cJun- und ATF-2-Protein im N-Terminus und sind durch eine Anhäufung negativ geladener Aminosäuren charakterisiert (Angel *et al.*, 1989; Hirai *et al.*, 1990; Livingstone *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995). Nicht so detailliert untersucht ist die TAD der Fos-Proteine, doch besitzen alle vier Mitglieder der Fos-Familie direkt N-terminal der bZIP-Region eine solche Domäne, die ebenfalls durch negativ geladene Aminosäuren charakterisiert ist (Abate *et al.*, 1991; Lucibello *et al.*, 1991). Zusätzlich wurden im C-Terminus zwei Motive identifiziert, HOB1 und HOB2 (Sutherland *et al.*, 1992), die gemeinsam eine effiziente transaktivierende Funktion ausüben können. HOB1 und HOB2 sind konservierte Sequenzen, die auch in der Transaktivierungsdomäne der Jun-Proteinfamilie zu finden sind. Eine der zwei, für die Regulation entscheidenden Phosphorylierungsstellen (Serin 73) in der TAD des cJun-Proteins befindet sich in HOB1.

Homolog dazu existiert ein Threonin-Rest (Threonin 232) in HOB1 des Fos-Proteins, von dem angenommen wird, daß auch er entscheidend für die Regulation der Aktivität durch Phosphorylierung ist (Deng und Karin, 1994).

Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1

Die Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen: auf der Ebene der Transkription der AP-1-Untereinheiten, posttranslational, beim Transport in den Kern, über Protein-Protein-Interaktionen oder über Modifikationen, die sowohl DNA-Bindungsaffinität als auch Transaktivierungspotential beeinflussen können. Zusätzlich ist auch bei der Degradation von AP-1 eine Regulation möglich. Die verschiedenen Möglichkeiten der Regulation sollen exemplarisch für cJun detailliert erläutert werden.

Zur Regulation von cJun über die DNA-Bindungsaffinität sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden: Zum einen können Wechselwirkungen mit anderen Proteinen die Bindung von AP-1 an die spezifischen Bindestellen in den Promotoren von Zielgenen verhindern. Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion mit dem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD (Bengal *et al.*, 1992) oder dem E1A-Onkoprotein des Adenovirus (Offringa *et al.*, 1990; van Dam *et al.*, 1990, Hagemeyer *et al.*, 1993). So hemmt E1A die Expression der Kollagenase indem es die DNA-Bindung von cJun-Homo- und cJun/cFos-Heterodimeren verhindert (Hagemeyer *et al.*, 1993). Ebenso ist ein spezifisches Inhibitorprotein, IP-1, charakterisiert worden, das die DNA-Bindung durch direkte Wechselwirkungen reguliert (Auwerx und Sassone-Corsi, 1991, 1992). Die Hemmung des aktivierten Glukokortikoid-Rezeptors auf AP-1-vermittelte Genexpression beruht ebenfalls auf direkten Protein-Protein-Interaktionen, jedoch ohne daß die DNA-Bindung beeinflußt wird (Jonat *et al.*, 1990; Schüle *et al.*, 1990b; König *et al.*, 1992).

Zum anderen können posttranslationale Modifikationen die Affinität der DNA-Bindung herabsetzen. So verhindert die Phosphorylierung der Serine an den Positionen 243 und 249 sowie der Threonine an den Positionen 231 und 239 in der cJun-DNA-Bindedomäne die Interaktion mit der DNA (Boyle *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1992). Als mögliche Kinasen, die hierfür verantwortlich sind, kommen Caseinkinase II (CKII) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK 3) in Frage (Boyle *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1992). Durch TPA-Behandlung oder UV-Bestrahlung der Zellen nimmt die Phosphorylierung an diesen Positionen ab, wodurch sich die Bindungsaffinität erhöht (Boyle *et al.*, 1991, Devary *et al.*, 1992; Radler-

Pohl *et al.*, 1993). Über den Mechanismus dieser Dephosphorylierung und die darin involvierten Phosphatasen ist jedoch nichts bekannt.

Neben der Phosphorylierung scheint auch eine Redoxreaktion die Affinität der DNA-Bindung zu beeinflussen (Abate *et al.*, 1990; Oehler *et al.*, 1993). Oxidation des Cysteins an Position 269 in der DNA-Bindedomäne führt zu einer Hemmung der DNA-Bindung. Die *in vitro* Reduktion durch chemische Substanzen, z.B. DTT, oder durch den zellulären Faktor Ref-1 hat deren Aktivierung zur Folge (Xanthoudakis *et al.*, 1992). Eine völlig Redox-unabhängige Regulation erhält man jedoch nur durch Mutation dieses Cysteinrestes zusammen mit der Mutation des Serins an Position 243 (Oehler *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1993). Interessanterweise sind im vJun, dem viralen, onkogenen Gegenstück zu cJun, genau diese zwei Aminosäuren mutiert. Dadurch könnte sich vJun den negativ auf die DNA-Bindung wirkenden Regulationsmechanismen entziehen. Dies hätte eine maximale, konstitutive DNA-Bindungsaktivität zur Folge, die zu der Onkogenität von vJun beitragen könnte.

Die Aktivierung der Expression des *c-jun*-Gens als Antwort auf externe Stimuli erfolgt sehr schnell und ist von Protein-Neusynthese unabhängig (Angel *et al.*, 1988b; Ryseck *et al.*, 1988; Lamph *et al.*, 1988). Solche Stimuli sind z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine, Tumorpromotoren, Karzinogene und die Expression verschiedener Onkogene, wie E1A (van Dam *et al.*, 1990), v-mos (das Onkoprotein des Maloney Maus Sarkoma Virus; Schönthal und Feramisco, 1990) oder Ha-ras (Sistonen *et al.*, 1989). Vermittelt wird die Aktivierung durch zwei AP-1-ähnliche Promotor-Elemente, jun1 (TGACATCA) und jun2 (TTACCTCA) (Angel *et al.*, 1988b; van Dam *et al.*, 1990, 1993; Devary *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1992). An diese Bindestellen sind ständig, d.h. unabhängig vom Aktivierungszustand der Zellen, cJun/ATF-2- Heterodimere oder ATF-2-Homodimere gebunden (Angel *et al.*, 1988b; Deng und Karin, 1993; van Dam *et al.*, 1993, 1995; Herr *et al.*, 1994). Dies schließt eine Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität als Antwort auf externe Signale aus. Die transkriptionelle Aktivierung wird vielmehr durch posttranslationale Modifikationen vermittelt, die das Transaktivierungspotential erhöhen (Rozek und Pfeifer, 1993; Herr *et al.*, 1994). Diese Aktivierung beruht auf der Phosphorylierung der Serine an den Positionen 63 und 73 in der Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins und der Threonine an den Positionen 69 und 71 in der Transaktivierungsdomäne des ATF-2-Proteins (Pulverer *et al.*,

1991; Smeal *et al.*, 1991, 1992; Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1996). Diese Aminosäuren werden durch eine Klasse von Proteinkinasen phosphoryliert, die als JNKs (*Jun-N*-terminale *K*inasen) oder auch als SAPKs ("stress activated protein kinases") bezeichnet werden. Diese Kinasen liegen am Ende von Signaltransduktionskaskaden, welche externe Signale in den Zellkern übertragen. Sie führen dort, durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, zu Veränderungen in der Expression spezifischer Gene.

Wege der Signaltransduktion

JNK/SAPKs gehören zur Klasse der MAP-Kinasen ("*mitogen-activated protein kinases*"). MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die nach Stimulation einer ganzen Reihe von Zelloberflächen-Rezeptoren sehr schnell aktiviert werden. Dies erfolgt durch Doppelphosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest (Ray und Sturgill, 1987). Diese Proteinkinasen sind entscheidende Vermittler der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern und kontrollieren dadurch die Expression von Genen, die essentiell für viele verschiedenen Prozesse, wie Zellwachstum und Differenzierung sind (Marshall, 1995).

Bis jetzt unterscheidet man in Säugetierzellen drei Unterfamilien der MAP-Kinasen. Sie unterscheiden sich in ihrem Phosphorylierungsmotiv und ihrer Substratspezifität (Dérillard *et al.*, 1995; Moriguchi *et al.*, 1995): ERK1 und ERK2 ("*extracellular signal-regulated protein kinases*") werden v.a. durch Wachstumsfaktoren und Phorbolster aktiviert (zur Übersicht siehe: Marshall, 1995); JNK/SAPKs mit mindestens zehn verschiedenen Isoformen (Hibi *et al.*, 1993; Dérillard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996) und die p38-MAP-Kinase. Sowohl JNK/SAPKs als auch die p38-MAP-Kinase werden durch Zytokine und zellulären Streß, wie z.B. Hitzeschock, osmotischen Schock oder UV-Strahlung, aktiviert (Galcheva-Gargova *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995). Diese Proteinkinasen sind evolutionär konserviert. So kennt man in Hefen die jeweils homologen Kinasen, die alle von getrennten Signaltransduktionswegen aktiviert werden. Diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege folgen einem gemeinsamen Schema: Die MAP-Kinasen, deren Substrate v.a. Transkriptionsfaktoren (z.B. cJun, Elk-1, c-Myc, usw.) darstellen, werden aktiviert durch Phosphorylierung durch die "stromaufwärts" gelegene MAP-Kinase-Kinase. Diese wird ebenfalls von einer

Proteinkinase, MAP-Kinase-Kinase-Kinase, durch Phosphorylierung aktiviert. In Abb. 2 sind zur Übersicht die drei, in Säugetierzellen bekannten MAP-Kinase-Signaltransduktionswege schematisch dargestellt (siehe auch: Davis, 1994, 1995; Karin, 1995; Kortenjann und Shaw, 1995; Kyriakis und Avruch, 1996).

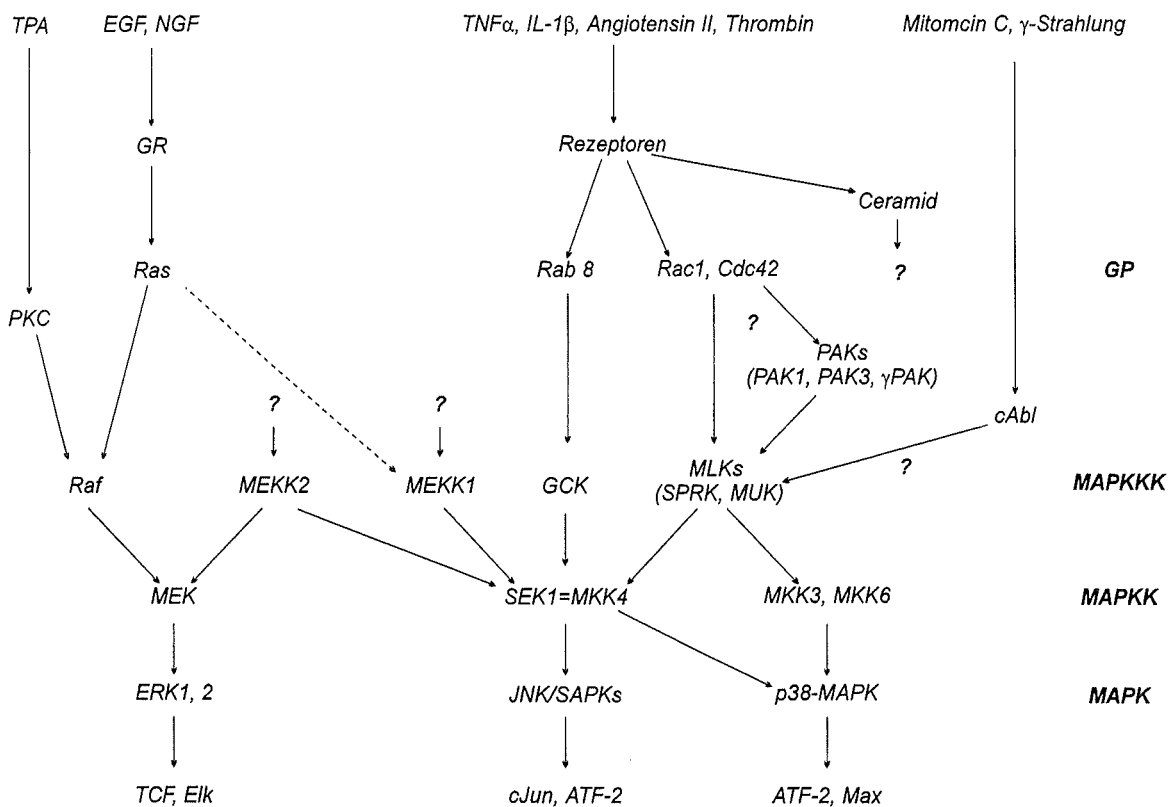


Abb.2: Schematische Darstellung der MAP-Kinasen-Signaltransduktionswege.

ATF: aktivierender Transkriptionsfaktor; EGF: epidermaler Wachstumsfaktor; ERK: "extracellular signal-regulated kinase"; GCK: "germinal center kinase"; GP: kleine GTP-bindende Proteine; GR: "growth factor receptors"; IL-1β: Interleukin-1β; JNK: Jun-N-terminale Kinase; MAPK: "mitogen-activated protein kinase"; MAPKK: MAP-Kinase-Kinase; MAPKKK: MAP-Kinase-Kinase-Kinase; MEK: MAPK/ERK-Kinase; MEKK: MEK-Kinase; MKK: MAP-Kinase-Kinase; MLK: "mixed lineage kinase"; MUK: "MAPK-upstream kinase"; PAK: "p21-activated protein kinase"; PKC: Proteinkinase C; SAPK: Streß-aktivierte Proteinkinase; SPRK: "SH3 domain-containing proline-rich kinase"; TCF: "ternary complex factor"; TNF: Tumornekrosefaktor; TPA: 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-azetat

JNK/SAPKs werden an einem Threoninrest an der Position 183 und an einem Tyrosinrest an der Position 185 durch die JNK-Kinase, auch als SEK1 oder MKK4 bezeichnet, phosphoryliert und dadurch aktiviert (Sanchez *et al.*, 1994; Dérillard *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995). Dieses Enzym ist eine bispezifische Proteinkinase (d.h. sie kann sowohl Serin/Threonin- als auch Tyrosinreste phosphorylieren), die mit der MAPK/ERK-Kinase (MEK) strukturell verwandt ist. SEK1/MKK4 wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Welches die dafür verantwortliche Kinase ist, ist nicht vollständig aufgeklärt. Als ein möglicher Kandidat wurde MEKK1 beschrieben (Minden *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994).

Als Aktivatoren der MAPK/ERK-Kinase wurden c-Raf, c-Mos und MEKK identifiziert (Cantley *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1991; Vojtek *et al.*, 1993; Johnson und Vaillantcourt, 1994). Der Aktivierung von c-Raf liegt ein komplexer Mechanismus zugrunde, der das Adapterprotein Grb2, den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos, die Tyrosinkinase Src und Ras beinhaltet (Devary *et al.*, 1992; zur Übersicht siehe: Davis, 1994, 1995).

p38-MAP-Kinase kann sowohl durch den JNK/SAPK-Aktivator SEK1/MKK4 als auch durch spezifische, nah verwandte Proteinkinasen, MKK3 und MKK6, phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Dérillard *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1996). Über die MAP-Kinase-Kinase-Kinase dieses Signalweges ist noch wenig bekannt.

Geht das Signal von einem aktivierten Rezeptor in der Plasmamembran aus, können sowohl im ERK- wie auch im JNK/SAPK-Signaltransduktionsweg GTP-bindende Proteine beteiligt sein. Für den JNK/SAPK-Signalweg wurden die kleinen, GTP-bindenden Proteine Rac1 und Cdc42 charakterisiert (Bagrodia *et al.*, 1995; Coso *et al.*, 1995a, b; Minden *et al.*, 1995; Olson, *et al.*, 1995).

Abnormale Funktionen von Proteinen innerhalb dieser Signalketten, die bekanntesten sind die Produkte der Onkogene *src*, *ras* und *raf*, kann in Zellen einen tumorigenen Phänotyp hervorrufen. Dabei reicht eine konstitutive Aktivierung meist schon für die Tumorgenese aus (Cowley *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994). Infolgedessen stellen MAP-Kinasen eine kritische Komponente in der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung dar. Ein Eingreifen in diesen fein regulierten Mechanismus durch die verschiedenen Klassen von krebsauslösenden Substanzen wird als Ursache für die Transformation von Zellen angesehen.

Zielsetzung der Arbeit

Viele verschiedene Induktoren haben einen aktivierenden Einfluß auf die Transkription des Proto-Onkogens *c-jun*. Diese Aktivierung wird in jedem Fall durch die beiden AP-1-ähnlichen Bindestellen im *c-jun*-Promotor und die daran gebundenen cJun/ATF-2-Hetero- und ATF-2-Homodimere vermittelt. Die Frage ist, wie verschiedenste Agenzien zur Erhöhung des Transaktivierungspotentials der an den Promotor gebundenen Faktoren durch die Induktion der Phosphorylierung in ihren Transaktivierungsdomänen führen können. Zur Klärung dieser Frage sollte die Analyse ganz verschiedener Agenzien dienen, deren primärer Wirkungsmechanismus sich mit Sicherheit unterscheidet: auf der einen Seite das E1A-Onkoprotein des menschlichen Adenovirus, auf der anderen Seite die alkylierende Substanz MMS. Dazu möchte ich die initialen Interaktionen mit zellulären Komponenten und die Signaltransduktionswege, die zu dem gemeinsamen Endpunkt - der Phosphorylierung von cJun und ATF-2 - führen, untersuchen.

Der erste Schritt dabei ist die Charakterisierung der Proteinkinasen, welche durch E1A bzw. MMS aktiviert werden und direkt cJun und/oder ATF-2 phosphorylieren. Schritt für Schritt sollen dann die, von diesen Stimuli ausgelösten Signalwege aufgeklärt werden. Im weiteren möchte ich die folgenden Fragen beantworten: Wie schnell erfolgt die Aktivierung? Ist dazu Protein-Neusynthese notwendig? Sind schon bekannte Signalwege involviert, und wie spezifisch ist die Aktivierung? Welche weiteren zellulären Komponenten spielen eine Rolle? An welcher Stelle greift E1A bzw. MMS ein, und welche Komponenten werden gemeinsam benutzt?

Material

Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wäßrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Azetyl-Coenzym A	Sigma, München
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose (SeaKem LE)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumazetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Casaminsäuren	Difco, Detroit
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Buchs
EDTA	Merck, Darmstadt
EGF	Sigma, Deisenhofen
Eichproteine, vorgefärbt	BioRad, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylazetat	Merck, Darmstadt
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker, Verviers

Gelatine	Merck, Darmstadt
Genitacin-Sulfat (G418)	Life Technologies, Gaitherburg
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Miobill-Plastikwolle	Migros, Basel
N,N,N',N'-tertramethylenethyldiamin	BioRad, München
N,N'-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
N-Azetylcystein	Sigma, Deisenhofen
N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Boehringer, Mannheim
Nukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Pepstatin	Boehringer, Mannheim
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Serva, Heidelberg
SDS	Roth, Karlsruhe
TPA	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München
tRNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Difco, Detroit
Tween20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Induktoren und Inhibitoren

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma, Deisenhofen
Methylmethansulfonat (MMS)	Serva, Heidelberg
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	Serva, Heidelberg
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	Calbiochem, La Jolla

Von diesen Substanzen wurden konzentrierte Stammlösungen in Wasser angesetzt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

N-Azetylcystein (NAC)	Sigma, Deisenhofen
3-Aminobenzamid (ABA)	Sigma, Deisenhofen
Butionin-S,R-sulfoximin (BSO)	Sigma, Deisenhofen
Glutathion (GSH)	Fluka, Buchs
Suramin (Germanin)	Bayer, Leverkusen

Diese Agenzien wurden kurz vor der Induktion als konzentrierte Stammlösungen frisch angesetzt und ohne Lagerung direkt ins Zellkulturmedium gegeben.

Ethylnitrosourea (ENU), 3x umkristallisiert (freundlicherweise von Dr. Manfred Rajewski zur Verfügung gestellt), wurde als konzentrierte Stammlösung in DMSO gelöst und maximal einen Monat lang bei -80°C gelagert.

Östrogen wurde kurz vor der Induktion frisch in DMSO gelöst und aus der konzentrierten Stammlösung ohne Lagerung direkt ins Zellkulturmedium gegeben.

Geräte und Verbrauchsmaterial

Axioskop Mikroskop	Zeiss, Jena
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Hereus, Stuttgart
DC-Platten (Kieselgel-beschichtet)	Macherey-Nagel, Düren
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München BRL, Eggenstein Hofer Scientific Instr., USA
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Hyperfilm XR [®]	Amersham-Buchler, Braunschweig
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckmann, Stuttgart
Mikrozentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen

Perkin Elmer Cetus 9600 Thermocycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran (Immobilon)	Millipore, Bedford
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiscan PLUS MKII Elisa-Reader	Labsystems, Finnland
Transferapparat für Western Blot	BioRad, München
Transilluminator (IL-350M)	Bachhofer, Reutlingen
Ultrazentrifugen (L8-70)	Beckmann, Stuttgart
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vakuum-Konzentrator ("speed vac")	Savant, Farmingdale
3MM Whatman Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen (Quick Seal)	Beckmann, Stuttgart

Enzyme

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Promega (Madison), Pharmacia (Freiburg) oder United States Biochemicals (Cleveland) bezogen.

Radiochemikalien

L- ³⁵ S-Methionin	555 MBq/ml
α- ³⁵ S-dATP	370 MBq/ml
γ- ³² P-ATP	370 MBq/ml
α- ³² P-dCTP	370 MBq/ml
D-threo-(dichlorazetat-1- ¹⁴ C)-Chloramphenicol	7,4 MBq/ml

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

Antikörper

- anti ERK2 (D-8) Santa Cruz, Heidelberg
monoklonal, IgG_{2b} aus Maus, gerichtet gegen die Aminosäuren 345-358 des C-Terminus von ERK2 der Ratte

- anti Flag-probe (D-8) Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, affinitätsgereinigt, IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen das acht Aminosäuren lange Peptid: D-Y-K-D-D-D-D-K
- anti HA (Klon 12CA5) Boehringer, Mannheim
monoklonal, IgG_{2b} aus Maus, gerichtet gegen die HA-Peptidsequenz Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A des menschlichen Influenza-Haemagglutininproteins
- anti JNK1 (C-17) Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, affinitätsgereinigt, IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 369-384 des C-Terminus von menschlichen JNK1
- anti JNK2 (N-18) Santa Cruz, Heidelberg
polyklonal, affinitätsgereinigt, IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 5-22 des N-Terminus von menschlichen JNK2
- anti E1A (M37) von E. Harlow, MGH Cancer Center, Charleston, zur Verfügung gestellt
monoklonal, IgG aus Maus, gerichtet gegen den N-Terminus des E1A-Proteins
- anti E1A (M73) von P. Jansen-Dürr, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt
monoklonal, IgG aus Maus, gerichtet gegen den C-Terminus des E1A-Proteins

Nährmedien für die Bakterienkultur

- PSI-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,4% MgSO₄; 10 mM KCl; pH 7,7
- TY-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,1% Casaminsäuren; 5% NaCl
- SOB-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2, mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄
- SOC-Medium: SOB + 20 mM Glukose

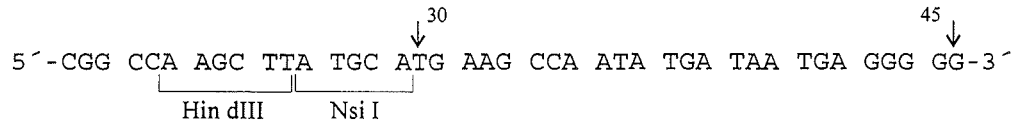
Bakterienplatten wurden durch Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter Medium hergestellt.

Lösungen und Puffer

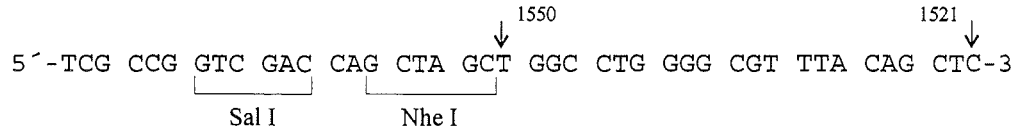
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6
- 20xSSC: 3 M NaCl; 0,25 M Na-Zitrat; pH 6,5
- TBE: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
- TE: 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

Oligonukleotide

E1As

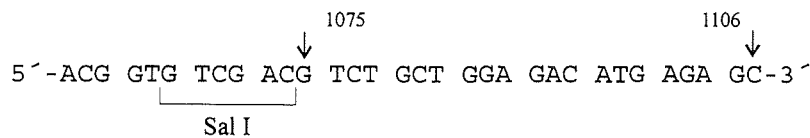


E1Aas3



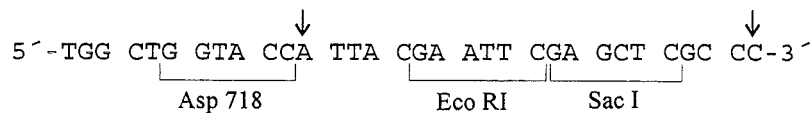
Die Zahlen über der Sequenz geben die Positionen der Adenovirus Serotyp 5 E1A-cDNA an.

hERs1



Die Zahlen über der Sequenz geben die Positionen der hER cDNA an (Green *et al.*, 1986).

hERas1



Die Pfeile markieren die Hybridisierungsregion mit der "polycloning site" des pSP64-Vektors.

Plasmidebakterielle GST-Expressionsplasmide

- GST-Jun
(van Dam *et al.*, 1995) erhalten von P. Angel, DKFZ,
Heidelberg
- GST-Jun^{63/73}-Mutante
(van Dam *et al.*, 1995) erhalten von P. Angel, DKFZ,
Heidelberg
- GST-ATF-2
(van Dam *et al.*, 1995) erhalten von H. van Dam, Leiden,
Holland
- GST-ATF-2, Thr69, 71, Ser90-Mutante
(Livingstone *et al.*, 1995) erhalten von N. Jones, ICRF, London,
UK
- GST-JNK/SAPK
(Yan *et al.*, 1994) erhalten von J. Woodgett, Ontario
Cancer Institut, Toronto, Kanada

eukaryontische Expressionsplasmide

- Δ MT-E1A-neo
(Hagmeyer *et al.*, 1996) erhalten von P. Angel, DKFZ,
Heidelberg
- MEKK1, Δ MEKK1(K432M)
(Minden *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995) erhalten von A. Lin und M. Karin,
Center for Molecular Genetics, La
Jolla, USA
- HA-SAPK, HA-SEK
(Yan *et al.*, 1994) erhalten von J. Woodgett, Ontario
Cancer Institut, Toronto, Kanada
- Flag-p38
(Dérillard *et al.*, 1995) erhalten von J. Han, Scripps Research,
Institut, La Jolla, USA
- -73/+63 Coll-CAT erhalten von P. Angel, DKFZ,
Heidelberg
- pBl CAT 37 erhalten von A. C. B. Cato,
Forschungszentrum Karlsruhe
- pKCK₂ ER erhalten von A. C. B. Cato,
Forschungszentrum Karlsruhe
- pGKneo12ER, pGKneo13ER und pGKneoER

Zur Klonierung der Plasmide pGKneo12ER und pGKneo13ER wurde das Adenovirus Serotyp 5 12S-E1A-Gen von dem Plasmid pJF12 und das 13S-E1A-Gen von dem Plasmid pHIIG (Haley *et al.*, 1984) mit Hilfe der PCR-Methode und den Oligonukleotiden E1As und E1Aas3 amplifiziert. Über die in den Primer enthaltenen Hind III und Sal I Schnittstellen wurde die E1A-Fragmente in den Hind III/Sal I-geschnittenen pGKneo-Vektor ligiert.

Die Hormon-Bindedomäne des humanen Östrogenrezeptors wurde ebenfalls mit Hilfe der PCR-Methode und den Oligonukleotiden hERs1 und hERas1 von dem ES-HE14-Plasmids (Eilers *et al.*, 1989) amplifiziert. Über die in den Primern enthaltenen Sal I und Asp 718 Schnittstellen konnte das ER-Fragment hinter das jeweilige E1A-Gen kloniert werden, sodaß das E1A als Fusionsprotein mit der Östrogenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors exprimiert wird.

Zur Klonierung des Kontrollplasmid pGKneoER wurde das ER-Fragment über die Sal I und Asp 718 Schnittstellen in den "leeren" pGKneo-Vektor (ohne E1A) kloniert.

Bakterienstämme

- E. coli DH5 α ; Genotyp: F⁻, ϕ 80 Δ lacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169
- E. coli XL1 blue; Genotyp: F^{'::}Tn10*proA*+b+*lacI*^q, *d(lacZ)*M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, (Nal^r), *thi*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac*

Zelllinien

- GM637 mit Simian Virus (SV40) transformierte, menschliche Haut-Fibroblasten, von P. Angel, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt
- 293 mit Adenovirus Serotyp5 E1A transformierte, menschliche, embryonale Nierenzellen, von D. Bohmann, EMBL, Heidelberg zur Verfügung gestellt
- L929 Mausfibroblastenzelllinie von H. J. Rahmsdorf, IGEN, Karlsruhe zur Verfügung gestellt
- WT56 3T3-ähnliche, embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie (Brüsselbach *et al.*, 1995), von E.F. Wagner, IMP, Wien zur Verfügung gestellt.

Methoden

1. Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 6% CO₂, 95% Luftfeuchte und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C; 1,4 bar; 20 min). Alle verwendeten Zellen wurden in Dulbecco's MEM (DMEM) mit 10% FCS kultiviert. Aus diesen Zelllinien abgeleitete stabile Transfektantenklone wurden zusätzlich mit G418 unter Selektionsdruck kultiviert.

Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS (37°C) gewaschen und für einige Sekunden mit Trypsin-Lösung (0,25%) gespült. Die Trypsin-Lösung wurde abgesaugt, erneut 1/10 des ursprünglichen Mediumvolumens Trypsin-Lösung zupipettiert und für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis, wurden die Zellen auf -80°C abgekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden sie in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

Einfriermedium: DMEM + 20% FCS + 10% DMSO

Behandlung von Zellen mit Induktoren

Zur Behandlung von Zellen mit ABA, BSO, CdCl₂, EGF, ENU, MMS, MNNG, NAC, TNF α , GSH und Östrogen wurden die Substanzen direkt aus konzentrierten Stammlösungen ins Medium pipettiert.

Bei UV-Bestrahlung wurden die Zellen, nach Waschen mit PBS, ohne Medium oder Puffer in der geöffneten Petrischale mit 40 J/m² bestrahlt. Das ursprüngliche Medium wurde zurück auf die Zellen gegeben. Kontrollzellen wurden, abgesehen von der Bestrahlung, in gleicher Weise behandelt.

Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen (Graham und van der Eb, 1973)

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsiniert und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 10 ml Medium in einer 10 cm-Petrischale eingesät. Für den Transfektionsmix wurden 5 - 15 μ g DNA in 250 mM CaCl₂ gelöst und dann Tropfen für Tropfen mit dem gleichen Volumen 2xHBS gemischt. Nach 20 min wurde das Kalziumphosphat/DNA-Präzipitat tropfenweise, über die Zellkulturschale verteilt, ins Medium gegeben. Die Zellen wurden 8 - 14 h lang im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je ca. 5 ml PBS (Entfernen des Präzipitates) wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen vor der Induktion für weitere 8 - 14 h im Brutschrank inkubiert und, falls nötig, für zusätzliche 12 h gehungert (DMEM ohne FCS). Für die stabile Transfektion wurden die Zellen nach Entfernen des Präzipitates für 24 h unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Danach wurde erneut trypsiniert und die Zellen auf drei Petrischalen mit G418-haltigem Medium (800 μ g/ml) verteilt. Nach etwa 10-14 Tagen bildeten sich mikroskopisch sichtbare Kolonien, die mit Hilfe einer 20 μ l-Eppendorfpipette gepickt und als Einzelklone weitervermehrt wurden.

2xHBS: 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; 50 mM HEPES

Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

Die Zellen, die in Kultur radioaktiv markiert werden sollten, wurden zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde ein möglichst geringes Volumen an Markierungsmedium auf die Zellen gegeben. Zum Medium wurden 7,4 MBq/ml ³⁵S-Methionin zugesetzt und die Zellen für 3 h im Brutschrank des Isotopenlabors (6% CO₂; 37°C) inkubiert. Um flüchtige, radioaktive Abbauprodukte des Methionins zu binden, wurden die

Zellkulturschalen auf ein Aktivkohlebett gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das radioaktive Medium mit der Pipette abgenommen. Die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS gewaschen, mit 800 µl RIPA lysiert und abgeschabt. Die zelluläre DNA wurde durch sechsmaliges Pipettieren mit einer blauen Pipettenspitze geschert. Danach wurde das Zellysat in ein Beckmann-UZ-Röhrchen transferiert und 30 min lang bei 50000 UpM, 2°C zentrifugiert (Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, bei -80°C eingefroren oder geteilt und in neue 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen zu vorgelegten 20 µl ProteinA-Sepharose (mit entsprechenden Antikörpern vorgekoppelt) zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Hinweis: Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, alle Puffer waren eisgekühlt. Proteinaseinhibitoren wurden dem RIPA-Puffer aus frisch angesetzten, konzentrierten Stammlösungen direkt zugesetzt.

Markierungsmedium: Methionin-defizientes RPMI; 0,4 mM L-Leuzin; 0,4 mM L-Lysin-HCl;
2 mM Glutamin; 0,5% FCS
RIPA: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM NaCl; 0,5% NP40; 0,5% NaDOC; 0,1% SDS;
0,5 mM PMSF; je 1 mg/ml Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin

Präparation von Zellen ohne Kern (Zytoplasten) nach Burke (1981)

24 Stunden vor der Entkernung wurden 1×10^6 Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Für die Entkernung wurde die Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium (37°C) gefüllt und Cytochalasin B in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Danach wurden die Flaschen sofort in die vorgewärmte (37°C) Zentrifuge (Sorvall R2C; GSA Rotor) gegeben und die Zellen 30 min lang bei 8500 UpM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Karyoplasten-Pellet entfernt, die Zytoplasten einmal mit Zellkulturmedium gewaschen und 16 h lang im Brutschrank inkubiert bevor sie für anschließende Analysen induziert wurden. Die Effizienz der Entkernung wurde mittels Anfärben von Zytoplasten und intakten Zellen mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff Hoechst 33528 überprüft.

2. Analyse von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Einen Hinweis auf Verunreinigungen gibt die OD bei 280 nm (hier absorbieren Phenol, DNA und Proteine). Das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} sollte im Idealfall 1,8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde die Probe mit Wasser auf mindestens 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) wurde gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurde 3 min zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C oder 1 Stunde bei -80°C . Das Präzipitat wurde bei 13000xg, 20 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend im Vakuum getrocknet.

3. DNA-Methoden

3.1 DNA-Präparation

Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysozymbilösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung und Mischen wurden 150 µl 3 M Natriumazetat zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Aus dem Überstand wurde mit 1 ml Ethanol die Plasmid-DNA präzipitiert (5 min bei Raumtemperatur) und durch 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM sedimentiert. Nach dem Waschen mit 80% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 30 - 50 µl Wasser gelöst.

Lysozymbilösung: 4 µg/ml Lysozym; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0
alkalische Lösung: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Plasmid-DNA Maxi-Präparation

- mittels Ionenaustauscher-Säulenchromatographie

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3600xg sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und bei 2000xg 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip 500-Säulen (Quiagen Inc.) laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

Selektionsmedium: TY + 100 µg/ml Ampicillin
Puffer P1: 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A
P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS
P3: 3 M Kaliumazetat pH 5,5

- mittels CsCl-Gradienten

Eine Bakterienkolonie wurde in 200 ml TY-Nährmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000xg zentrifugiert, der Bakterienniederschlag in 10 ml Lysozym-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml SDS-Lösung und 15 ml 3 M Natriumazetatlösung wurde erneut 30 min auf Eis inkubiert. Dadurch ausgefallene Proteine und hochmolekulare, genomische DNA wurden durch Zentrifugation (1700xg, 20 min, 4°C) pelletiert. Zum Überstand wurde das 2,5-fache Volumen kaltes Ethanol gegeben und die Plasmid-DNA bei -20°C, 30 min lang gefällt. Die durch Zentrifugation (1700xg, 10 min, 4°C) pelletierte Plasmid-DNA wurde getrocknet und erneut in 8 ml 0,1 M Natriumazetat und 50 mM Tris pH 8,0 gelöst. Die Ansätze wurden mit 4,2 g Cäsiumchlorid versetzt, 250 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in "Quick Seal" Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einer Beckmann L8-70-Ultrazentrifuge (mit Vertikalrotor Vti65) mindestens 16 h lang bei 55000 UpM (20°C) zentrifugiert. Durch die Ausbildung eines Dichtegradienten fokussierte die intakte und die gebrochene Plasmid-DNA in zwei distinkten Banden. Die intakte DNA wurde mit Hilfe einer Spritze abgezogen, in ein neues Röhrchen überführt und unter identischen Bedingungen für weitere 6 h im Dichtegradienten zentrifugiert. Nach erneutem Abziehen der Plasmid-DNA wurden zwei Teile Wasser zu der Lösung pipettiert und diese zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrere Male mit Wasser-gesättigtem Butanol extrahiert. Die klare DNA-Lösung wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 9000 UpM, 10 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0,5 - 1 ml Wasser gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C gelagert.

Lysozym-Lösung: 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0
SDS-Lösung: 0,2 M NaOH; 1% SDS

3.2 Klonierungstechniken

Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wäßrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu ent-

sprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro μg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h.

Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit $1\ \mu\text{l}$ alkalischer Phosphatase ($2\ \text{U}/\mu\text{l}$) in einem Endvolumen von $50\ \mu\text{l}$ CIP-Puffer versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei $5'$ -überhängenden Enden durch 30 min Inkubation bei 37°C . Danach wurde erneut $1\ \mu\text{l}$ Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C dephosphoryliert.

Bei $3'$ -überhängenden und glatten Enden wurde zweimal 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert (ebenfalls mit Zugabe von $1\ \mu\text{l}$ Enzym nach den ersten 30 min).

In beiden Fällen wurden anschließend $42,5\ \mu\text{l}$ H_2O ; $10\ \mu\text{l}$ TNE und $2,5\ \mu\text{l}$ SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA.

CIP-Puffer: $50\ \text{mM}$ Tris pH 9,0; $1\ \text{mM}$ MgCl_2 ; $0,1\ \text{mM}$ ZnCl_2 ; $1\ \text{mM}$ Spermidin
1xTNE: $100\ \text{mM}$ NaCl; $10\ \text{mM}$ Tris pH 8,0; $1\ \text{mM}$ EDTA pH 8,0

Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern

Etwa $2\ \mu\text{g}$ Oligonukleotid- oder Linker-DNA wurden mit $1\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ ATP und $1\ \mu\text{l}$ T4-Polynukleotid-Kinase ($10\ \text{U}/\mu\text{l}$) in einem Endvolumen von $10\ \mu\text{l}$ mit Kinase-Puffer versetzt. Die Reaktion erfolgte eine Stunde lang bei 37°C und wurde durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

Kinase-Puffer: $66\ \text{mM}$ Tris pH 7,6; $10\ \text{mM}$ MgCl_2 ; $15\ \text{mM}$ DTT; $1\ \text{mM}$ Spermidin; $0,2\ \text{mg/ml}$ BSA

Auffüllen von $5'$ -Überhängen

Die DNA wurde mit $2\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ DTT, $1\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ dNTP-Mix und $1\ \mu\text{l}$ *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, $5\ \text{U}/\mu\text{l}$) in einem Endvolumen von $20\ \mu\text{l}$ 1xPolymerase-Puffer versetzt. Nach 30 min Reaktion ($3'$ -Überhänge werden abgebaut) bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

dNTP-Mix: je $10\ \text{mM}$ dATP; dCTP, dGTP und dTTP in $10\ \text{mM}$ Tris pH 7,5
1xPolymerase-Puffer: $7\ \text{mM}$ Tris pH 7,5; $7\ \text{mM}$ MgCl_2 ; $50\ \text{mM}$ NaCl

Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl in Ligationspuffer für 16 h bei 16°C inkubiert. Für Linker-Ligationen wurden 2 µl des phosphorylierten Linkers eingesetzt.

Ligationspuffer: 50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP

Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase-chain-reaction", PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cycler (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10xPCR-Puffer, 1/10 Volumen 10xdNTP-Lösung, je 1/10 Volumen 10xPrimer (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

10xPCR-Puffer: 500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂
10xdNTP-Lösung: je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0

Sequenzierung von DNA

Gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des "T7-Sequense-Kit" der Firma USB, Cleveland Ohio, sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,2 mM EDTA; 0,2 M NaOH denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 2,5 ng des entsprechenden Sequenzier-Oligonukleotids gemischt, auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit α-³⁵S-dATP erfolgt die Kettenabbruch-Reaktion mit den entsprechenden Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer und 3 min

Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamid / 8,3 M Harnstoff-Gel aufgetragen.

Formamid-Probenpuffer: 20 mM EDTA pH 7,8; 99% Formamid; 0,03% Xylencyanol;
0,03% Bromphenolblau

Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Der Bakterienstamm *E.coli* XL1blue wurde auf einer Agarplatte mit TY-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur (PSI-Medium) angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer $OD_{600}=0,28$ inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 ml PSI-Medium wurde die Kultur bis zu einer $OD_{600}=0,48$ inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A6.9, 5000 UpM, 10 min, 4°C) wurden diese in 10 ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB1-Puffer aufgenommen und für 3 h auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 5000 UpM), in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und in 50 µl Aliquots abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut.

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumazetat; 10 mM CaCl₂; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂; 15% Glycerin

Transformation kompetenter Bakterien

50 µl kompetente Bakterien wurden mit Plamid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen vermischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 37°C für 3 min und Inkubation für 5 min auf Eis, wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Kultur für 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,5% Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose

Agarplatte: 1,5% Bacto-Agar in TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin

3.3 DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5%-ige Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25 µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1xTBE gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Lauf-puffer (1xTBE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

1xTBE: 90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0
Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mindestens 10 min lang in deionisiertes Wasser gelegt bevor man die im UV-Durchlicht sichtbar gemachte, gewünschte Bande ausschneidet. Das Gelstückchen, das das entsprechende DNA-Fragment enthält, wurde in ein zur Hälfte mit Plastikwolle gefülltes, unten durchbohrtes, 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Durch Zentrifugation (3000xg, 10 min) gelangte die zu isolierende DNA aus dem Gelstückchen in das untere Reaktionsgefäß, während die Agarose durch die Plastikwolle zurückgehalten wurde. Die auf diese Weise isolierte DNA wurde entweder zuerst einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, oder direkt in Ligationsreaktionen eingesetzt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 6-10% Polyacrylamidgele verwendet. Für ein 6%-iges Gel benötigt man 6 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30 : 0,8) Stammlösung, die mit 3 ml TBE und 21 ml Wasser versetzt wird. Nach Zufügen und

Mischen von 25 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfatlösung (10%) wurde das Gel zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Polymerisieren der Gellösung wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur gespannt und als Elektrodenpuffer 1xTBE eingefüllt. Nach Auftragen der Proben in Glycerin-Puffer erfolgte die Auftrennung bis zum Einwandern der Proben ins Gel bei 100 V, danach bei 240 V. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten getrennt und 15 min unter leichtem Schütteln in 200 ml Wasser mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht.

1xTBE: 90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0
Glycerin-Puffer: 10 mM EDTA pH 8,0; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Die Auftrennung von DNA-Molekülen unter denaturierenden Bedingungen, z.B. nach der DNA-Sequenzierung, erfolgte mit Hilfe der Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese. Die entsprechenden Gele wurden mit einer Dicke von 0,2 mm zwischen zwei 20 x 40 cm große Glasplatten gegossen. Dazu wurden 30 ml Gellösung (100 ml deionisiertes Acrylamid: Bisacrylamid (30 : 0,8), 50 ml 10xTBE, 250 g Harnstoff, auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt) mit 30 µl TEMED und 300 µl 10% APS (w/v) versetzt, gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Kammern mit 1xTBE gefüllt. Für eine optimal denaturierende Wirkung des Harnstoffs ist eine Temperatur von ca. 60°C notwendig. Daher wurde ein halbstündiger Vorlauf des Gels bei 30 mA durchgeführt bevor die Proben aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 30 mA. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel auf Whatman-Papier der entsprechenden Größe transferiert, bei 80°C getrocknet und über Nacht bei RT ein Röntgenfilm exponiert.

1xTBE: 90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0

4. RNA-Methoden

Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacci, 1987)

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Induktion mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lösung D lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und mittels einer Injektionsspritze nach mehrmaligem Auf- und Abziehen in ein steriles 12 ml-Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 μ l 2 M Ammoniumazetat (pH 4,0) wurde mit 2 ml wassergesättigtem Phenol ausgeschüttelt, 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben, erneut geschüttelt und das Gemisch für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (Centrikon H-401; Rotor AS 4.13; 10000 UpM; 10 min; 4°C) wurde die wäßrige Phase abgezogen und die RNA mit dem gleichen Volumen Isopropanol für 1 h bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, das RNA-Pellet zweimal mit Ethanol (80%) gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in 100 μ l Wasser gelöst (5 min; 65°C) und die Konzentration bestimmt.

Lösung D: 4 M GiSCN; 25 mM NaCitrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl; 0,1 M 2-Mercaptoethanol

RNase Protektionsanalyse

A. Präparation von ³²P-markierten Riboproben durch *In-vitro*-Transkription

Als Matrize für die *In-vitro*-Transkription dienten linearisierte Plasmide, bei denen in umgekehrter Orientierung Genfragmente (*c-jun*, MT IIa) von einem SP6-Bakteriophagen-Promotor aus transkribiert werden können. Zur Synthese der *antisense* RNA-Probe wurden 6 μ l α -³²P-CTP; 4 μ l 5xSP6-Transkriptionspuffer; 2 μ l 100 mM DTT; 4 μ l NTP-Lösung; 1 μ l 250 μ M CTP; 1 μ l RNasin; 1 μ l Matrizen-DNA (500 ng/ μ l) und 1 μ l SP6-RNA-Polymerase (50 U/ μ l) gemischt und für 60 min bei 40°C inkubiert. Zur Entfernung der Matrizen-DNA wurden der Reaktion 5 μ l 10xDNase I (1 U/ μ l) zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 μ g Hefe-tRNA, 150 μ l 4 M Ammoniumazetat (4 M) und 200 μ l Wasser zugegeben und Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA in der wäßrigen Phase wurde abgezogen, mit Ethanol präzipitiert, gewaschen (70% Ethanol) und getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 40 μ l Wasser aufgenommen und 1 μ l davon im Szintillationsmeßgerät gemessen. 1 μ l der Probe hatte im allgemeinen eine Aktivität von ca. 2×10^6 cpm.

5xSP6-Transkriptionspuffer: 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 30 mM MgCl₂; 10 mM Spermidin
NTP-Lösung: je 2,5 mM ATP, UTP, GTP

B. Hybridisierung der radioaktiv markierten Riboprobe mit Gesamt-RNA

20 µg Gesamtzell-RNA wurden zur Entfernung von eventuell noch vorhandenen DNA-Spuren mit DNase I behandelt. Dazu wurden der RNA-Lösung 5 µl 10xDNase-Puffer, 1 µl DNase I und 1 µl RNasin zugesetzt, der Ansatz mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert und das gewaschene Pellet im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, der 1x10⁶ cpm Riboprobe enthielt. Die Ansätze wurden 5 min bei 85°C denaturiert und zur Hybridisierungsreaktion für 12 - 16 h bei 45°C inkubiert.

Danach wurden die Hybridisierungsansätze mit 300 µl RNase-Reaktionspuffer gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Verdauungsreaktion wurde mit 3,2 µl SDS (20%) abgestoppt, mit 2,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 5 µg Hefe-tRNA wurde mit Ethanol präzipitiert und gewaschen (80%-Ethanol). Die Proben wurden im Vakuum-Konzentrator getrocknet, das Pellet in 4 µl Formamid-Ladepuffer gelöst und in einem 6%-igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 5000 cpm endmarkierter pUC9/Hae3-Marker verwendet. Zur Autoradiographie wurde auf das getrocknete Gel bei -80°C, unter Verwendung einer Verstärkerfolie, ein Röntgenfilm exponiert.

Hybridisierungspuffer: 80% Formamid; 20% 2 M NaCl; 200 mM PIPES pH 6,4; 5 mM EDTA
RNase-Reaktionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 300 mM NaAzetat pH 7,0; 5 mM EDTA;
600 U/ml RNase T1; 40 µg/ml RNase A
Formamid-Ladepuffer: 80% Formamid; 1 mM EDTA; 0,02% Bromphenolblau; 0,02% Xylencyanol

5. Protein-Methoden

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* (1951)

Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 500 µl mit Lösung I aufgefüllt und dann mit 1 ml Lösung II gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl Lösung III zugegeben und für weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur

Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannter Proteinkonzentration parallel dazu verarbeitet. Je 300 µl des Reaktionsansatzes wurden dann in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 660 nm im ELISA-Reader (Titertek Multiskan PLUS) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

Lösung I: 2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
 Lösung II: 2% NaK-Tartrat : 1% CuSO₄ x 5H₂O : Lösung I = 100 : 100 : 1
 Lösung III: 50% Folin-Ciocalteus-Reagenz (in Wasser verdünnt)

Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert (Laemmli, 1970). Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Ethanol läßt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernt man das Ethanol und gießt die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines Kammes läßt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit einfachem Volumen 2xProbenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 20 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel entweder direkt oder nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau getrocknet oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot).

Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED
 Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
 Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS
 Probenpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% 2-Mercaptoethanol

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen

Proteine, die in SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung und danach in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Färbelösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure
Entfärbelösung: 50% Methanol; 7,5% Essigsäure

Immunoblot-Analyse von Proteinen ("Western Blot")

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer Naß-transferzelle (Trans-Blot, BioRad, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Zelle wurde mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte entweder über Nacht mit 60 mA oder 2 h mit 600 mA bei 4°C. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 10% fettfreier Milch in PBST geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in PBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min in PBST gewaschen und danach 1 h mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in PBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBST wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden waren, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei dem hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm² Membranfläche, Amersham Buchler, Braunschweig) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol
PBST: PBS + 0,4% Tween 20

Immunpräzipitation von Proteinen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und auf Eis in 0,5-0,8 ml RIPA-Puffer lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben in Mikrozentrifugenröhrchen überführt, kurz gemischt (Vortex) und durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 13.000 UpM, 4°C). Die Überstände wurden in Gegenwart von Protein A-Sepharose (25 µl gepacktes Volumen) und 0,5 µg des entsprechenden Antikörpers für 2 h bei 4°C rotiert. Die an die Sepharose gekoppelten Antigen/Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (5 s, 13000 UpM, 4°C) pelletiert und dreimal mit je 1 ml RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Vor Zugabe von 20 µl Probenpuffer wurde die Sepharose mit einer Kanüle trockengesaugt. Die Proben wurden 5 min aufgekocht und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel entsprechender Konzentration aufgetrennt.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM NaCl; 0,5% NP-40; 0,5% NaDOC; 0,1% SDS;
0,5 mM PMSF; je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin
Probenpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau;
5% 2-Mercaptoethanol

Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität ("CAT-Assay")

Die Zellen einer Zellkulturschale (9 cm) wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Gummispatel in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 6000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl Tris-HCl (0,25 M; pH 7,8) resuspendiert. Durch dreimaliges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C wurden die Zellen aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden bei 13000 UpM für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt nach der Methode von Lowry bestimmt.

Zur Messung der spezifischen Enzymaktivität wurden gleiche Proteinmengen in 80 µl Tris (0,25 M; pH 7,8) mit 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol (Substrat) und 20 µl Azetyl-Coenzym-A (Azetylgruppen-Donor) gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml Ethylazetat. Das Chloramphenicol und seine azetylierten Produkte konnten durch starkes Mischen extrahiert werden. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min; 13000 UpM) getrennt und die Ethylazetat-Phase abgenommen. Das Ethylazetat wurde im Vakuumkonzentrator eingetrocknet, das Pellet in 20 µl Ethylazetat aufgenommen und punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch aufsteigende Chromatographie mit

Chloroform/Methanol (9:1). Nach etwa 45 min wurde die DC-Platte getrocknet und ein Röntgenfilm bei RT exponiert.

Nach Entwicklung des Autoradiogramms konnten die Signale auf dem Röntgenfilm den Positionen der azetylierten Formen des Chloramphenicols auf den DC-Platten zugeordnet werden. Das nicht-azetylierte Chloramphenicol ist am unpolarsten und wandert daher am langsamsten. Die 1'-azetylierten, 3'-azetylierten und 1',3'-azetylierten Formen sind polarer und wandern deshalb schneller. Durch Quantifizierung des azetylierten und nicht-azetylierten Anteils des Chloramphenicols kann die Aktivität des CAT-Enzyms berechnet werden.

Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

Eukaryontische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden (Smith und Johnson, 1988). Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Rohlysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde dazu in eines der drei pGEX-Plasmide (das Leseraster der Insertionsstelle ist jeweils um ein Nukleotid verschoben - damit stehen alle drei Leseraster zur Verfügung) an das 3'-Ende des GST-Gens fusioniert.

Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3000xg, 10 min, 4°C) sedimentiert, in eiskaltem Puffer E (5% des Kulturvolumens) suspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Gegenwart von 1 mg/ml Lysozym lysiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die bakterielle DNA wurde mechanisch im Ultraschall geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10000xg; 15 min; 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS gequollener Glutathion-Agarose (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein) für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und mit dem zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 5 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in Fraktionen aus der Säule eluiert.

Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen eiskaltes PBS (+10% Glyzerin) dialysiert. So gereinigtes Fusionsprotein wurde bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 l mit H_2O
Puffer E: 50 mM HEPES pH 7,9; 15 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA; 5 mM DTT

Herstellen der Na_3VO_4 -Stammlösung (Kypka *et al.*, 1988)

Na_3VO_4 (100 mM) wurde in etwas weniger als dem Endvolumen Wasser gelöst und mit verdünnter HCl (1:5) bis zur Gelbfärbung titriert. Danach wurde die Lösung im kochenden Wasserbad erhitzt bis die gelbe Färbung wieder verschwand; der pH-Wert wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur bestimmt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis der pH-Wert stabil bei 10,0 war. Anschließend wurde das Endvolumen eingestellt und die Stammlösung für maximal 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

In-Gel-Kinase-Assay

Zur Herstellung des Proteinextraktes für den In-Gel-Kinase-Assay wurden die behandelten Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten auf Eis gestellt, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in je 500 μl eiskaltem Lysis-Mix pro 9 cm-Petrischale abgeschabt. Der Extrakt wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt, 1 min kräftig geschüttelt und in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM, 0°C , 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt eingesetzt oder bei -80°C gelagert werden.

Zum Vorreinigen der Extrakte wurden je Ansatz 40 μg GST-Fusionsprotein an etwa 100 μl in PBS gequollener Glutathion-Agarose durch 1 h Rotation bei 4°C gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde jeweils etwa 1 mg Proteinextrakt dazugegeben und erneut 2 h bei 4°C rotiert. Während dieser Inkubation können Proteine aus dem Extrakt mit dem Fusionsprotein interagieren. Nicht assoziierte Proteine werden durch dreimaliges Waschen mit je 400 μl HBIB entfernt. Zu den Proteinen, die an das Fusionsprotein und damit an die Glutathion-Agarose gebunden vorliegen, wurden 20 μl 2xProbenpuffer pipettiert und 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 12,5% Polyacrylamidgel, welches in Ab- oder Anwesenheit von 150-180 μg Substrat pro ml Gellösung polymerisiert worden war.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel zum Entfernen des SDS zweimal 10 min lang in Puffer W + 20% Propanol gewaschen. Anschließend wurde das Gel zweimal 30 min in Puffer W äquilibriert und zur vollständigen Denaturierung der Proteine dreimal 30 min lang in 6M Harnstoff in Puffer W inkubiert. Die Renaturierung erfolgte schrittweise durch Inkubation des Gels in kaltem Puffer W + 0,04% Tween20 für 12-16 h bei 4°C und mindestens fünfmaligem Pufferwechsel. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Puffer K bei 30°C äquilibriert und die Kinase-Reaktion in 20 ml Puffer K + 250 µCi γATP bei 30°C für 1 h durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 150 ml Waschpuffer zugegeben und das Gel über mehrere Stunden mit mehrfachem Pufferwechsel gewaschen. Anschließend wurde das Gel getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Lysis-Mix:	10 mM Tris pH 7,0; 30 mM Natriumpyrophosphat; 100 µM Na ₃ VO ₄ ; 2 mM Jodessigsäure; 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 5 µM ZnCl ₂ ; 1% Triton X-100
HBIB:	20 mM HEPES pH 7,7; 50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl ₂ ; 0,1 mM EDTA; 0,05% Triton X-100
Probenpuffer:	0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; 5% 2-Mercaptoethanol
Puffer W:	50 mM HEPES pH 7,4; 5 mM 2-Mercaptoethanol
Puffer K:	25 mM HEPES pH 7,4; 5 mM 2-Mercaptoethanol; 10 mM MgCl ₂ ; 100 µM Na ₃ VO ₄
Waschpuffer:	5% Trichloressigsäure; 10 mM Natriumpyrophosphat

Reinigung der cJun- bzw. ATF-2-assozierten Kinasen

Der Proteinextrakt wurde wie beim In-Gel Kinase-Assay beschrieben präpariert. Alle Schritte erfolgten auf Eis oder in einem 4°C-kalten Raum unter Verwendung von eiskalten Puffern. 300 µg GST-Jun oder GST-ATF-2 Fusionsprotein wurden an 800 µl Glutathion-Agarose durch Inkubation bei 4°C 1 h lang unter Rotation gekoppelt. Um nicht gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Glutathion-Agarose anschließend dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Agarose mit dem gekoppelten Fusionsprotein wurde mit etwa 4 mg Proteinextrakt 2 h lang bei 4°C rotiert, dreimal mit HBIB gewaschen und anschließend in eine Säule gefüllt. Zur fraktionierten Elution der assoziierten Proteine wurden schrittweise 2 M Harnstoff in Puffer K auf die Säule pipettiert. Die in Eppendorf-Reaktion Gefäßen gesammelten 400 µl-Fractionen wurden 1 h lang gegen Puffer K + 10% Glycerin dialysiert. Je 2 µl wurden direkt in die *In-vitro*-Phosphorylierung eingesetzt und der Rest bei -80°C gelagert.

Für die *In-vitro*-Phosphorylierung wurden 2 µg Substrat mit 2 µl der einzelnen Fractionen und 5 µCi γATP in einem Endvolumen von 25 µl in Puffer K 20 min bei 30°C inkubiert.

Durch Zugabe von 25 µl 2xProbenpuffer wurde die Reaktion abgestoppt und der gesamte Ansatz in einem 12%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm exponiert.

HBIB: 20 mM HEPES pH 7,7; 50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA;
0,05% Triton X-100
Puffer K: 25 mM HEPES pH 7,4; 5 mM 2-Mercaptoethanol; 10 mM MgCl₂; 100 µM Na₃VO₄
Probenpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau;
5% 2-Mercaptoethanol

Immunkomplex-Kinase-Assay

Zur Herstellung des Proteinextraktes wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Induktion auf Eis gestellt, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl kaltem Lysis-Puffer aufgeschlossen. Der Extrakt wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 20 min bei 0°C und 13000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt in die Immunpräzipitation eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Nach Bestimmung der Proteingehalte der einzelnen Extrakte wurde die maximal mögliche Proteinmenge, so daß in jedem Ansatz die gleiche Menge an Protein vorhanden war, mit 1,5 µl des gewünschten Antikörpers bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einer Stunde wurden je Ansatz etwa 30 µl, in Lysis-Puffer gequollene Protein A-Sepharose zugegeben und erneut 1 h lang bei 4°C rotiert. Die über die spezifischen Antikörper an die Protein A-Sepharose gekoppelten Proteinkinasen wurden zweimal mit 300 µl Lysis-Puffer und einmal mit 300 µl Kinase-Puffer gewaschen. Die Kinase-Reaktion wurde mit 2 µg des entsprechenden Substrates, 5 µCi γATP, in einem Endvolumen von 25 µl in Kinase-Puffer direkt an den Immunkomplexen bei 30°C für 20 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, der Überstand mit dem phosphorylierten Substrat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 25 µl 2xProbenpuffer zupipettiert. Die Proben wurden 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in Waschpuffer geschwenkt, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm exponiert.

Lysis-Puffer: 20 mM Tris pH 7,5; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100;
10% Glycerin; 2 mM Natriumpyrophosphat; 25 mM β-Glycerophosphat;
1 mM Na₃VO₄; 1 mM PMSF; je 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin
Kinase-Puffer: 25 mM HEPES pH 7,4; 25 mM MgCl₂; 25 mM β-Glycerophosphat;
0,1 mM Na₃VO₄
Probenpuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau;
5% 2-Mercaptoethanol

Ergebnisse

Induktoren, wie z.B. UV-Strahlung, Tumorpromotoren (Bsp. der Phorbolester TPA), alkylierenden Agenzien (Bsp. MMS), Expression von Onkoproteinen (Bsp. E1A des Adenovirus) üben auf Organismen unterschiedliche Arten von Streß aus. Abhängig vom Zellsystem können sie alleine oder in Kooperation die Transformation von Zellen auslösen. Ein gemeinsames Charakteristikum ist die Aktivierung des *c-jun*-Proto-Onkogens. Sie wird vermittelt durch die Phosphorylierung von cJun/ATF-2-Heterodimeren, bzw. ATF-2-Homodimeren, welche ständig am *c-jun*-Promotor gebunden vorliegen. Obwohl diese Induktoren unterschiedliche Primäreffekte in der Zelle haben, führen sie über Signaltransduktionewege zu einem gemeinsamen Endpunkt: Die Steigerung der Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren. Die Aufklärung der verwendeten Signalwege gibt Aufschluß über die Regulationsmechanismen und -möglichkeiten mit denen eine Zelle komplexe Vorgänge wie Zellwachstum und Differenzierung steuert. In meiner Arbeit habe ich mich mit den Wirkungen der Expression des E1A Onkoprotein des menschlichen Adenovirus und den Wirkungen alkylierender Agenzien am Beispiel von MMS befaßt.

Teil I: E1A-induzierte Signaltransduktion

Das Onkoprotein E1A des Adenovirus kann als multifunktionaler Regulator definiert werden, der zwischen verschiedenen Komplexen der AP-1 Familie unterscheiden kann. cJun-Homo- und cJun/cFos-Heterodimere werden reprimiert, wohingegen cJun/ATF-2-Heterodimere und ATF-2-Homodimere, aktiviert werden. Als Konsequenz davon wird die Transkription des *c-jun*-Gens als Vertreter der Klasse der cJun/ATF-2- bzw. ATF-2/ATF-2-regulierten Gene stark aktiviert. In Adenovirus-transformierten Zellen wurde eine Hyperphosphorylierung der Faktoren festgestellt, die an den Promotor gebunden sind (Pulverer *et al.*, 1991; Smeal *et al.*, 1991, 1992; Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995). Damit scheint der Aktivierung durch das E1A Protein ein sehr ähnliches Prinzip wie nach UV-Bestrahlung zugrunde zu liegen. Die Signaltransduktionswege, die zur E1A-abhängigen Hyperphosphorylierung führen, sind jedoch nicht bekannt.

Der erste Schritt bei der Aufklärung dieser Signalwege war die Identifizierung der Proteinkinasen, die durch Expression von E1A aktiviert werden. Der Nachweis der schnellen Aktivierung von Proteinkinasen als Antwort auf die Stimulation von Zellen mit z.B. UV-Strahlung wurde erst in einem System möglich, das die Präparation des Zellextraktes zu entsprechend frühen Zeitpunkten nach der Stimulation erlaubt. Für den Nachweis der E1A-abhängigen Proteinkinasen standen jedoch nur Adenovirus-transformierte Zelllinien zur Verfügung, die E1A konstitutiv exprimieren. Um die direkten, schnellen Prozesse nach der Expression von E1A untersuchen zu können, war es notwendig, ein induzierbares Zellsystem zu etablieren. Dazu wurde die kodierende Sequenz von E1A mit dem Promotor des menschlichen Metallothionin (MT) IIa-Gens fusioniert und stabil in Zellen transfiziert. Der MT IIa-Promotor wird schnell und effizient durch Schwermetalle, wie z.B. Cadmium, induziert. Bei dem verwendeten Promotor handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der die AP1-Erkennungssequenz inaktiviert wurde. Dadurch ist die Basalaktivität stark reduziert, ohne die Induzierbarkeit durch Cadmium zu beeinträchtigen (P. Angel, nicht veröffentlicht). Dies ist auch aufgrund der Tatsache wichtig, da E1A, in Abwesenheit von E1B, bei hoher Expression Apoptose induziert (White *et al.*, 1991; White, 1993; Rao *et al.*, 1992; Debbas und White; 1993). Außerdem wurde dadurch der Nebeneffekt ausgeschlossen, den induzierte Jun-Proteine auf den Promotor ausüben können.

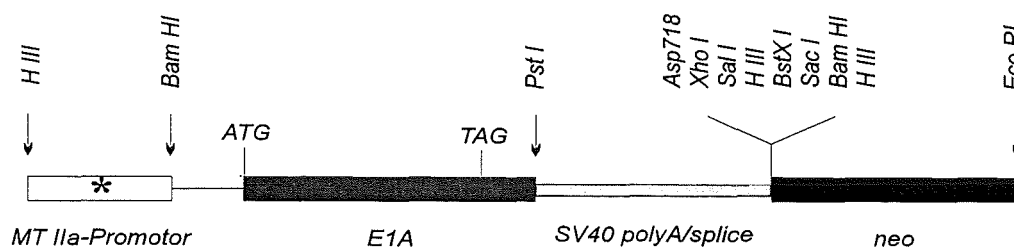


Abb. 3: Schematische Darstellung des Δ MT-E1A-neo-Plasmids

neo: Neomycin-Resistenzgen; E1A: E1A-Gen des Adenovirus Serotyp 5. Die Transkription des E1A-Gens steht unter der Kontrolle des Metallothionin IIa-Promotors (MT IIa-Promotor), bei dem die AP1-Erkennungssequenz mutiert wurde (*). Gekennzeichnet ist das Start- (ATG) und Stop- (TAG) Kodon und die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden.

Logarithmisch wachsende GM637 Zellen (menschliche Fibroblasten Zelllinie) wurden mit dem Δ MT-E1A-neo-Plasmid (Abb. 3, Hagmeyer *et al.*, 1996) mittels Kalziumphosphat transfiziert. Das im Vektor integrierte Neomycin-Resistenzgen erlaubte die direkte Selektion derjenigen transfizierten Zellen, die stabil das jeweilige Plasmid aufgenommen und dadurch Resistenz gegenüber G418 (Neomycinsulfat) erworben hatten. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Nach 10 bis 14 Tagen wurden 14 resistente Klone isoliert und vermehrt.

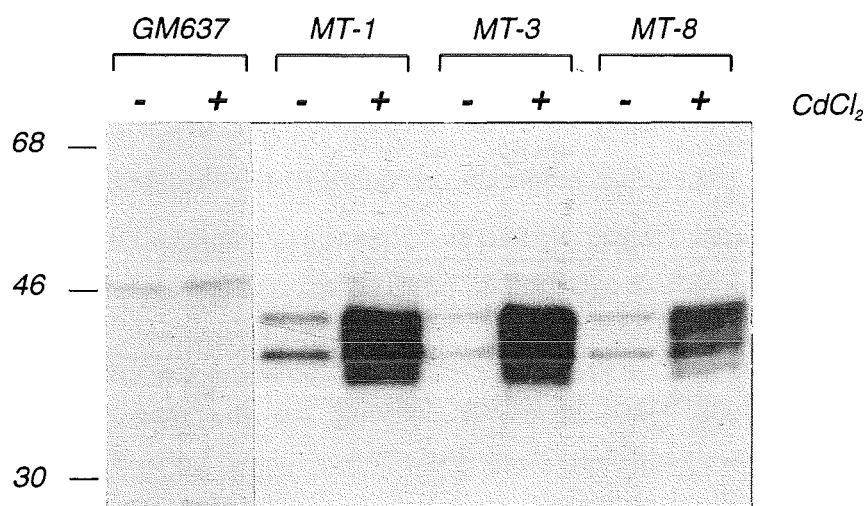


Abb. 4: Induzierte E1A-Expression in den stabil transfizierten GM637 Zellen

Kontrollzellen (GM637) und drei der stabil transfizierten Zellklone (MT-1, MT-3, MT-8) wurden 24 h lang in Medium mit 0.5% FCS "gehungert". Zwei Stunden nach der Induktion mit 5 μ M Cadmiumchlorid wurden die Zellen mit ³⁵S-Methionin in Kultur radioaktiv markiert und nach weiteren sechs Stunden geerntet. Radioaktiv markiertes E1A-Protein wurde mit Hilfe des E1A-spezifischen, monoklonalen Antikörpers M73 präzipitiert und die Immunpräzipitate in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Waschen und Trocknen des Gels wurde für die Autoradiographie ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Zur Kontrolle, ob das E1A-Protein in den Neomycin-resistenten Klonen exprimiert wird, wurden die nicht transfizierten Zellen und die isolierten Zellklone zwei Stunden nach der Induktion mit Cadmium in Kultur mit ^{35}S -Methionin markiert und nach weiteren sechs Stunden geerntet. Mit Hilfe des monoklonalen E1A-spezifischen Antikörpers M73 wurde das E1A-Protein immunpräzipitiert und die Präzipitate in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Man erkennt in den drei beispielhaft gezeigten Klonen die induzierte Expression von E1A (Abb. 4). Für die folgenden Versuche wurde der Klon MT-3 weiter verwendet, da er die niedrigste Basalexpression aufweist und maximal induzierbar ist.

Endogenes cJun wird durch TPA und E1A induziert

Um zu bestätigen, daß, ähnlich wie in Adenovirus-transfizierten Zellen, durch die Expression des exogenen E1A Veränderungen in der Expression von endogenem cJun auftreten, wurden die Kontrollzellen (GM637) und der induzierbare Zellklon MT-3 mit Cadmium induziert. Als Kontrolle diente die bekannte transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* durch den Phorbolster TPA. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion wurde die RNA aus den Zellen präpariert und durch RNase-Protektionsanalysen die Menge an exogen exprimierter Transkripte und die Expression endogener Gene bestimmt.

Nach TPA-Behandlung ließ sich sowohl in den Kontrollzellen als auch im MT-3 Klon die Induktion des endogenen *c-jun*-Gens innerhalb einer halben Stunde erkennen. Durch die Cadmium-Behandlung wurde in beiden Zelllinien das endogene Metallothionin IIA-Gen induziert. Diese Aktivierung war nach dreieinhalb Stunden erkennbar und war nach zehn Stunden nur marginal gesteigert. Zusätzlich kam es in dem stabilen MT-3 Zellklon nach dreieinhalb Stunden zur Induktion des exogenen MT-E1A und, als Folge davon, zur Aktivierung des endogenen *c-jun*-Gens. Die Transkriptionsraten beider Gene waren nach zehn Stunden wieder deutlich verringert. Diese Aktivierung des MT-E1A und des endogenen *c-jun* durch Cadmium trat in den Kontrollzellen (GM637) nicht auf (Abb. 5).

Mit diesen Experimenten konnte die Funktionalität des isolierten Zellklons MT-3 nachgewiesen werden, d.h. daß er nach Induktion mit Cadmium E1A exprimiert und es parallel dazu zur transkriptionellen Aktivierung des *c-jun*-Gens kommt.

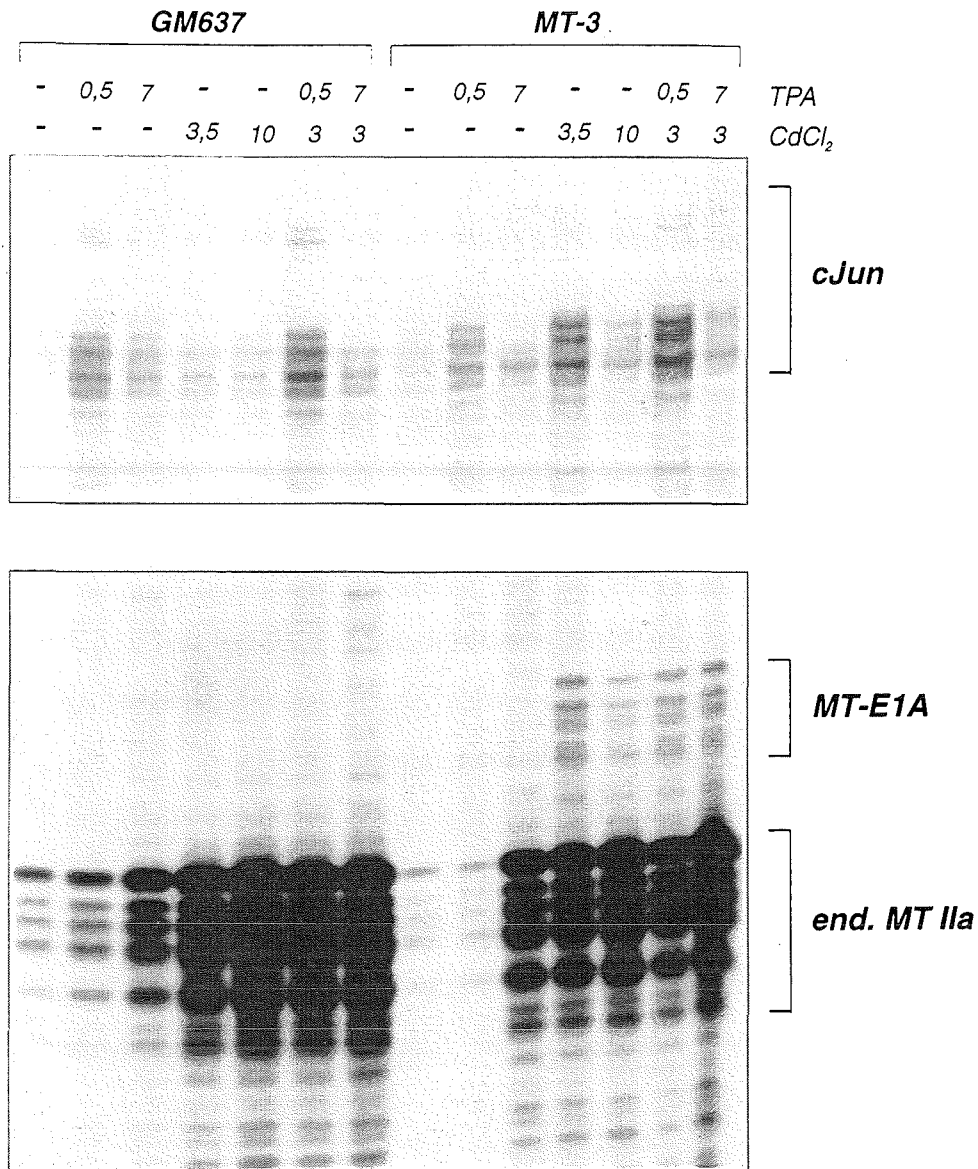


Abb. 5: Induktion von endogenem cJun durch TPA und E1A

Kontrollzellen (GM637) und der stabil transfizierte Zellklon MT-3 blieben entweder unbehandelt oder wurden mit Cadmiumchlorid (CdCl₂, 5 µM) und/oder TPA (100 ng/ml) behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten (siehe Beschriftung über der Abb.) geerntet. Bei Behandlung mit Cadmiumchlorid und TPA wurde immer zuerst mit Cadmiumchlorid und drei Stunden später zusätzlich unterschiedlich lange mit TPA (30 min bzw. 7 h) behandelt. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA präpariert und mit je 10 µg eine RNase-Protektionsanalyse durchgeführt. Die entstandenen, geschützten RNA-Fragmente wurden in einem 6%-igen Sequenzgel aufgetrennt.

cJun: von der c-jun-spezifischen RNA-Sonde geschützte, endogene *c-jun*-Fragmente
 MT-E1A: von der MT Ila-spezifischen RNA-Sonde geschützte, exogene E1A-Fragmente
 end. MT Ila: von der MT Ila-spezifischen RNA-Sonde geschützte, endogene MT Ila-Fragmente

E1A aktiviert JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase

Die Aktivierung des *c-jun*-Gens wird durch eine verstärkte Phosphorylierung der an den Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren vermittelt (Pulverer *et al.*, 1991; Smeal *et al.*, 1991, 1992; Livingston *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995). Zur Untersuchung darin involvierter Proteinkinasen ist es notwendig ein geeignetes Phosphorylierungssystem zu etablieren, bei dem ihre Aktivierung nach verschiedenen Stimuli getestet werden kann. Dazu verwendete ich UV-bestrahlte Zellen, bei denen bekannt ist, welche cJun-spezifische Kinasen durch die UV-Strahlung aktiviert werden. Durch Etablierung eines In-Gel-Kinase-Assays konnte ich einen Hinweis auf das Molekulargewicht dieser Kinasen erhalten. UV-bestrahlte (40 J/m^2) HeLa- und menschlichen 293 Zellen wurden zu definierten Zeitpunkten nach der UV-Induktion auf Eis lysiert. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mit bakteriell exprimierten GST-Jun-Fusionsprotein, gekoppelt an GSH-Agarose, inkubiert. Proteine, wie z.B. Proteinkinasen, können dadurch an das Fusionsprotein binden. Nach Waschen der GSH-Agarose wurden die daran assoziierte Proteine nach ihrer Größe in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dieses Gel enthält GST-Jun, das in die Gelmatrix einpolymerisiert wurde. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel schrittweise renaturiert. Durch Inkubation des gesamten Gels in einem geeigneten Puffer und radioaktiv markiertem ATP wird das einpolymerisierte Substrat an den Stellen radioaktiv phosphoryliert, zu denen eine spezifische Kinase aufgrund ihres Molekulargewichts gewandert war.

Auf der Autoradiographie sind zwei Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von etwa 46 und 54 kD erkennbar, die durch die UV-Bestrahlung aktiviert wurden. Dabei handelte es sich um die vor kurzem identifizierten *Jun-N*-terminalen Kinasen, JNKs, die auch als SAPKs ("stress-activated protein kinases") bezeichnet werden (Hibi *et al.*, 1993; Kyriakis *et al.*, 1994). Die Aktivierung war 10 Minuten nach der UV-Bestrahlung detektierbar und erreichte ein Maximum nach 30 Minuten. Verwendete man nur den GST-Anteil zum Vorreinigen der Extrakte (Beschriftung über der Abb. 6) oder als Substrat im Gel (Beschriftung rechts der Abb. 6), war keine Aktivierung einer Kinase zu erkennen (Abb. 6). Dies bedeutet, daß die aktivierten Kinasen, die bei Verwendung von GST-Jun zur Vorreinigung und als Substrat sichtbar wurden, spezifisch für den cJun-Anteil des Fusionsproteins waren.

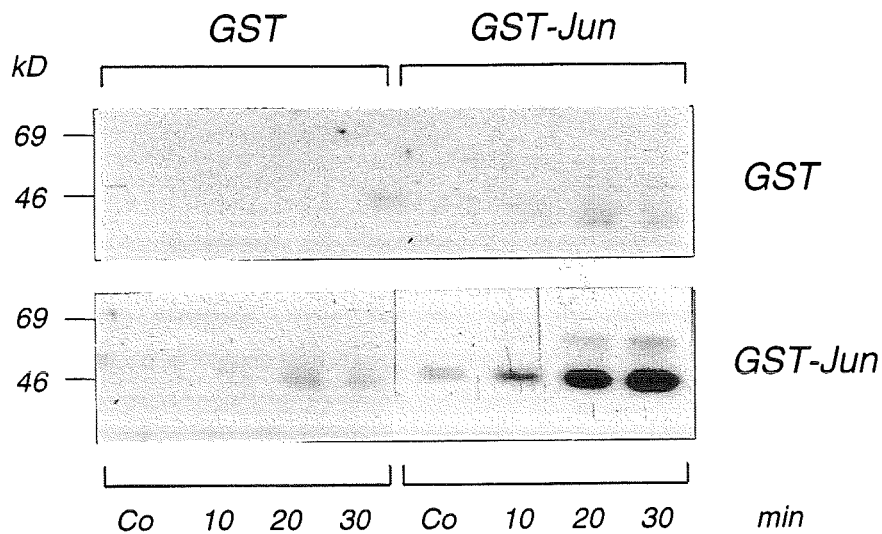


Abb. 6: UV-Strahlung induziert JNK/SAPKs

Menschliche 293 Zellen wurden entweder nicht behandelt oder mit 40 J/m^2 UV bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in Lysis-Puffer lysiert. Gleiche Mengen Proteinextrakt wurden mit je $30 \mu\text{g}$ bakteriell exprimiertem, an GSH-Agarose gekoppeltem GST- bzw. GST-Jun-Protein (Beschriftung über der Abbildung) für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Assoziierte Proteine wurden in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, in dem entweder $130 \mu\text{g/ml}$ GST- (oberes Gel) oder GST-Jun- (unteres Gel) Protein einpolymerisiert worden war. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel schrittweise renaturiert und das gesamte Gel für die Kinasereaktion für eine Stunde in Kinase-Puffer mit $9 \mu\text{Ci/ml}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bei 30°C inkubiert. Nach dem Waschen und Trocknen des Gels wurde für die Autoradiographie über Nacht ein Röntgenfilm exponiert.

Der Nachweis der Funktionalität des stabilen Zellklones MT-3 erlaubte es, dieses Zellsystem für die Untersuchung der durch E1A aktivierten Kinasen im In-Gel-Kinase-Assay zu verwenden. Dazu wurden GM637 und MT-3 Zellen mit Cadmium behandelt, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und jeweils gleiche Proteinmengen im In-Gel-Kinase-Assay eingesetzt. In dem E1A-induzierbaren Zellklon (MT-3) war nach zwei Stunden eine Aktivierung von zwei Kinasen erkennbar, die das einpolymerisierte GST-Jun phosphorylierten (Abb. 7). Diese Aktivierung erreichte ein Maximum nach 12 Stunden. Auch nach 36 Stunden war noch eine Kinase-Aktivität meßbar, sie war jedoch deutlich herabgesetzt. Die aktivierten Proteinkinasen besaßen ein Molekulargewicht von etwa 46

und 54 kD. Der Vergleich mit den nach UV-Bestrahlung aktivierten Proteinkinasen (siehe Abb. 6) deutete darauf hin, daß auch nach der Expression von E1A JNK/SAPKs für die Phosphorylierung des cJun-Proteins verantwortlich sind.

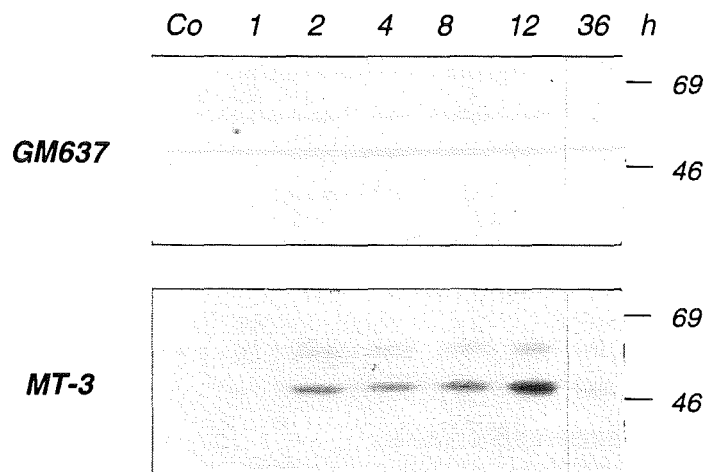


Abb. 7: E1A aktiviert zwei Kinasen in dem Cadmium-induzierbaren Zellklon MT-3

Die Kontrollzelllinie (GM637) und der stabil transfizierte Zellklon MT-3 wurden 24 h in Medium ohne FCS kultiviert und anschließend mit 3 μ M Cadmiumchlorid behandelt. Nach verschiedenen Zeiten (Beschriftung über der Abb.) wurden die Zellen auf Eis geerntet und mit gleichen Proteinmengen ein In-Gel-Kinase-Assay mit bakteriell exprimiertem GST-Jun als Substrat im Gel durchgeführt. Die Abbildung zeigt die über Nacht exponierte Autoradiographie.

Den direkten Nachweis, daß JNK/SAPKs durch die Expression von E1A aktiviert werden, lieferte der Immunkomplex-Kinase-Assay. Dazu wurden GM637 und MT-3 Zellen mit Cadmium induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper immunpräzipitiert und die Kinase-Reaktion im Immunkomplex durchgeführt. Die Phosphorylierung des Substrates GST-Jun zeigte, daß die aus dem MT-3-Zellextrakt präzipitierten JNK/SAPKs nach Cadmium-Behandlung aktiviert wurden. Diese Aktivierung folgte der gleichen Kinetik, die auch im In-Gel-Kinase-Assay beobachtet worden war. Sie war nach zwei Stunden erkennbar, erreichte ein Maximum

nach zwölf Stunden und nahm dann wieder ab (Abb. 8, rechte Seite). Die aus GM637-Zellextrakten präzipitierten JNK/SAPKs wurden durch die Cadmium-Behandlung nicht aktiviert (Abb. 8, linke Seite).

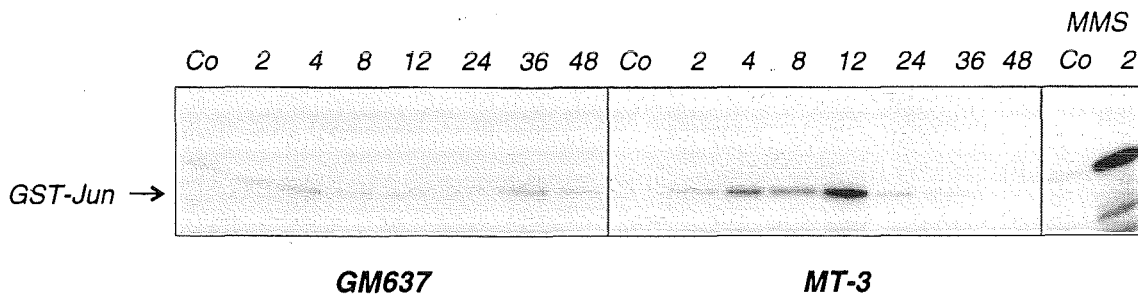


Abb. 8: Induktion von JNK1-Aktivität durch E1A

Kontrollzellen (GM637) und der stabil transfizierte MT-3 Zellklon wurden 24 h in Medium ohne FCS kultiviert, mit 3 μ M Cadmiumchlorid behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) auf Eis geerntet. Als positive Kontrolle wurden parallel dazu menschliche 293 Zellen entweder nicht behandelt (Co) oder zwei Stunden lang mit MMS behandelt. Aus jeweils gleichen Proteinmengen wurde JNK1 mit Hilfe des polyklonalen, JNK1-spezifischen Antikörpers (C-17, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-reaktion im Immunkomplex mit GST-Jun und [γ - 32 P]ATP als Substrat durchgeführt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

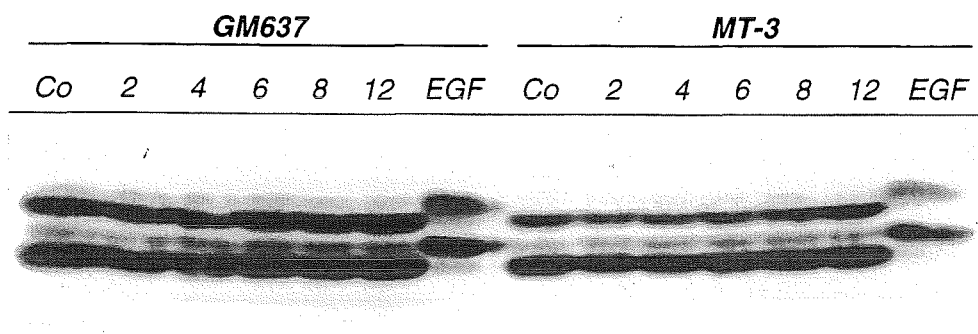
JNK/SAPKs gehören zu der Familie der Serin/Threonin-spezifischen MAP-Kinasen ("mitogen activated protein kinases"). Zu dieser Familie zählen, neben den JNK/SAPKs, noch zwei weitere Unterfamilien: ERK1, 2 ("extracellular signal-regulated kinases") und p38-MAP-Kinase (auch als MPK2 bezeichnet). Um zu untersuchen, welche Mitglieder dieser Familie durch die Expression von E1A in ihrer Aktivität verändert werden, wurde die Aktivität dieser MAP-Kinasen Unterfamilien ebenfalls analysiert.

Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 beruht auf einer Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes. Diese Phosphorylierung bewirkt ein retardiertes Laufverhalten der Proteine im SDS-Proteingel, das sich in einer Western Blot Analyse nachweisen läßt.

Die Behandlung der Zellen mit EGF führte, wie erwartet (zur Übersicht siehe: Marshall, 1995), zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 (Abb. 9A). Dies wurde im deutlich

verzögerten Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel erkennbar. Im Gegensatz dazu hatte die Cadmium-Behandlung weder in dem E1A-induzierbaren Zellklon MT-3 noch in den GM637 Zellen einen Einfluß auf den Aktivitätszustand von ERK1 und ERK2 (Abb. 9A). Die Aktivierung der p38-MAP-Kinase läßt sich in einem In-Gel-Kinase-Assay nicht nachweisen, da diese Proteinkinase im Gel nicht renaturierbar ist. Auch die Verwendung des Immunkomplex-Kinase-Assays ist nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper existiert, der die p38-MAP-Kinase in einer aktiven Form präzipitieren kann. Aus diesen Gründen wurden logarithmisch wachsende MT-3 Zellen (E1A-Klon) mit einem Plasmid transient transfiziert, das für eine Epitop- (Flag-) markierte p38-MAP-Kinase kodiert. Nach der Transfektion blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden unterschiedlich lange mit Cadmium behandelt und danach geerntet. Die exogene p38-MAP-Kinase konnte mit Hilfe Flag-spezifischer Antikörper präzipitiert werden. Da p38-MAP-Kinase ATF-2, nicht jedoch cJun, phosphorylieren kann, habe ich für die anschließende *In-vitro*-Phosphorylierung bakteriell exprimiertes GST-ATF-2 aufgereinigt. Die Aktivität der exogenen Flag-p38-MAP-Kinase wurde anhand der Phosphorylierung des Substrates GST-ATF-2 gemessen.

A



B

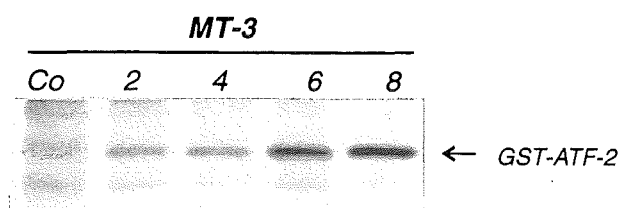


Abb. 9: E1A aktiviert p38-MAP-Kinase, jedoch nicht ERK1 und ERK2

A. Logarithmisch wachsende Kontrollzellen (GM637) und stabil transfizierte MT-3 Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden unterschiedlich lange (Angaben in Stunden) mit Cadmiumchlorid oder für zehn Minuten mit EGF (EGF) behandelt. Anschließend wurden die Zellen direkt in 2xProbenpuffer lysiert und 30 µg Gesamtzell-extrakt in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot) und mit einem ERK1/ERK2-spezifischen Antikörper (ERK2, D-2, Santa Cruz) nachgewiesen.

B. Logarithmisch wachsende MT-3 Zellen wurden mit je 8 µg Flag-p38-Expressionsplamid pro Petrischale (9 cm) transient transfiziert (Kalziumphosphat-Methode). Zwölf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Medium ohne FCS "gehungert" und nach weiteren 24 h entweder nicht behandelt (Co) oder mit 5 µM Cadmiumchlorid induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) wurden die Zellen lysiert und aus gleichen Proteinmengen die exogene Flag-p38-MAP-Kinase mit Hilfe eines Flag-spezifischen monoklonalen Antikörper (Flag-probe, D-8, Santa Cruz) präzipitiert. Die Kinase-Aktivität wurde im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-ATF-2 und [γ - 32 P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm sechs Stunden lang exponiert.

Cadmium-Behandlung und die dadurch induzierte Expression von E1A resultierten in einer Aktivierung der Flag-p38-MAP-Kinase nach zwei Stunden. Sie erreichte ein Maximum nach acht Stunden (Abb. 9B).

Damit konnte nachgewiesen werden, daß die Expression von E1A sowohl JNK/SAPKs als auch p38-MAP-Kinase mit der gleichen Kinetik aktiviert. Im Gegensatz dazu blieb die dritte Unterfamilie der MAP-Kinasen (ERK1 und ERK2) unbeeinflusst. Für die E1A-vermittelte *c-jun*-Aktivierung könnten somit JNK/SAPKs und/oder p38-MAP-Kinase eine Rolle spielen.

E1A-Expression aktiviert SEK1

JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase sind Endpunkte von Signaltransduktionswegen, die durch extrazelluläre Induktoren initiiert werden können. Solche Signaltransduktionswege stellen im allgemeinen Kaskaden von Proteinkinasen dar, die sich nacheinander durch Veränderungen im Phosphorylierungsmuster aktivieren. So können JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase durch SEK1 (auch MKK4 oder JNK-Kinase genannt) stimuliert werden (Dérijard *et al.*, 1995). Eng verwandt mit SEK1 sind MKK3 und MKK6, die spezifisch nur p38-MAP-Kinase aktivieren (Dérijard *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1996). SEK1/MKK4 wiederum wird selbst ebenfalls durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität gesteigert.

Da E1A sowohl JNK/SAPKs als auch p38-MAP-Kinase induziert, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß auch die gemeinsame, direkt "stromaufwärts" gelegene Proteinkinase SEK1 aktiviert wird. Auch in diesem Fall ist die Verwendung des In-Gel-Kinase-Assays und der Immunpräzipitation endogener SEK1 - aus den gleichen Gründen wie bei der p38-MAP-Kinase bereits aufgeführt - nicht möglich. Ich habe deshalb einen Expressionsvektor, der für eine Hämagglutinin- (HA)-markierte SEK1 kodiert, transient in Zellen transfiziert. Anschließend blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden verschieden lange mit Cadmium (3 μ M) induziert. Mittels HA-spezifischer, monoklonaler Antikörper wurde die exogene SEK1 präzipitiert und ihre Aktivität im Immunkomplex-Kinase-Assay bestimmt. Als Substrat diente in diesem Experiment ein bakteriell exprimiertes GST-JNK/SAPK-Fusionsprotein. Die Cadmium-Behandlung bewirkte nur in dem stabilen Zellklon MT-3 eine transiente Aktivierung von SEK1. In GM637 Zellen war auch nach der Induktion mit Cadmium keine Aktivität erkennbar (Abb. 10).

Die Aktivierung von SEK1 ist auf die Expression von E1A zurückzuführen, die durch die Cadmium-Behandlung in den MT-3 Zellen induziert wird.

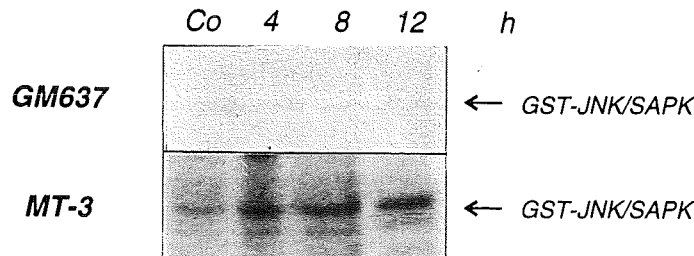


Abb. 10: Hämagglutinin- (HA-) markierte SEK1 wird durch E1A Expression aktiviert
 Logarithmisch wachsende GM637 und MT-3 Zellen wurden mit je 8 µg HA-SEK1-Expressionsplasmid pro Petrischale (9 cm) transient transfiziert (Kalziumphosphat-Methode). Zwölf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Medium ohne FCS "gehungert" und nach weiteren 24 h entweder nicht behandelt (Co) oder mit 5 µM Cadmiumchlorid induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) wurden die Zellen lysiert und aus gleichen Proteinnengen die exogene HA-SEK1 mit Hilfe eines HA-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Boehringer, Mannheim) präzipitiert. Die Kinase-Aktivität wurde im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-JNK/SAPK und [γ - 32 P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Klonierung von Östrogen-induzierbarer E1A-Expressionsvektoren

Obwohl das bis jetzt verwendete Cadmium-induzierbare Zellsystem für den Nachweis der Aktivierung verschiedener Kinasen (JNK/SAPKs, p38-MAP-Kinase und SEK1) geeignet ist, weist es einige Nachteile auf. Zum einen muß eine Zeitverzögerung, bedingt durch die Transkription und Translation des E1A-Proteins nach der Induktion, einberechnet werden, die eine genaue Aussage über die direkten, frühen Effekte von E1A erschwert. So kann in diesem Zellsystem nicht gemessen werden wie schnell die Proteinkinasen durch E1A aktiviert werden und ob dazu Protein-Neusynthese notwendig ist. Zum anderen läßt sich nicht abschätzen, welche weiteren Effekte das Schwermetall Cadmium in den Zellen auslöst. So könnte z.B. die Transkription und/oder die Aktivität zellulärer Proteinkinasen und/oder Phosphatasen beeinflusst werden, die einen indirekten Einfluß auf die

untersuchten Endpunkte haben und nur in den Zellen, die auch E1A exprimieren, zum Tragen kommen.

Um diese Kritikpunkte auszuräumen, habe ich einen Expressionsvektor hergestellt, der für ein chimäres Protein kodiert, das aus E1A und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (ER) besteht. In Abwesenheit von Östrogen assoziiert der ER-Anteil mit dem hsp90-Protein, das in jeder Zelle in ausreichender Menge vorhanden ist. Dadurch werden sämtliche Proteinfunktionen des Polypeptids inaktiviert. Bei Zugabe von Östrogen interagiert das Hormon mit der Bindedomäne, ersetzt das hsp90-Protein und aktiviert damit die Proteinfunktionen. Da die meisten Säugetierzellen in Kultur keinen endogenen Östrogenrezeptor exprimieren, wird bei Zugabe von Östrogen ausschließlich das exogene Fusionsprotein aktiviert. Die Expression des E1A/ER-Hybrids unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors erlaubt auch die Untersuchung direkter, schneller Effekte ohne Zeitverzögerung, da die Aktivierung auf der Ebene der Proteinfunktion und nicht auf der Transkriptionsebene stattfindet.

Zur Klonierung der Plasmide, die für diese Fusionsproteine kodieren, wurden das Adenovirus Serotyp 5 12S-E1A-Gen aus dem Plasmid pJF12 und das 13S-E1A-Gen von aus Plasmid pHIIG mit Hilfe der PCR-Methode amplifiziert. Über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen wurden die mittels Agarosegel gereinigten E1A-Fragmente in den pGKneo-Vektor ligiert.

Die Hormon-Bindedomäne des humanen Östrogenrezeptors wurde ebenfalls mit Hilfe der PCR-Methode amplifiziert. Als Matrizen-DNA diente das ES-HE14-Plasmid. Über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen konnte das ER-Fragment hinter das jeweilige E1A-Gen kloniert werden, so daß E1A als Fusionsprotein mit der Östrogenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors exprimiert wird. Als Kontrollplasmid wurde das ER-Fragment in den "leeren" pGKneo-Vektor (ohne E1A) kloniert. Zur Verdeutlichung wurde in Abb. 11 die Klonierungsstrategie skizziert.

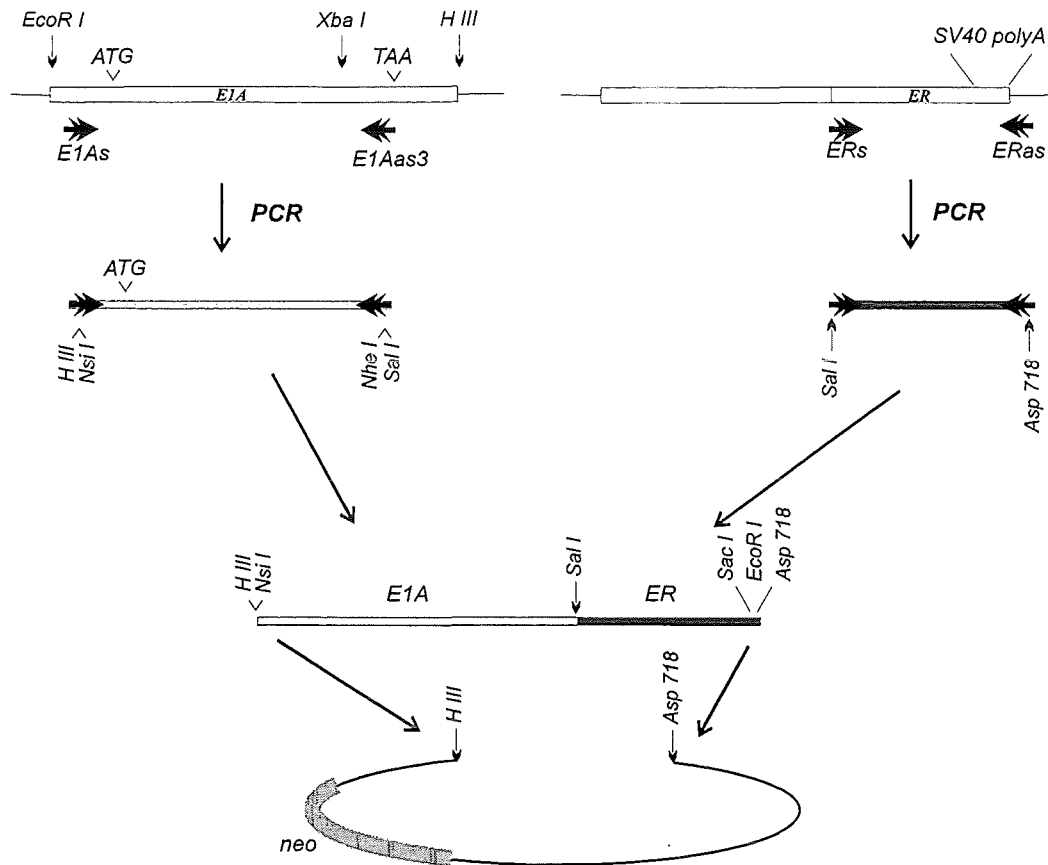


Abb. 11: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der induzierbaren E1A-ER-Konstrukte

Das E1A-Gen des Adenovirus Serotyp 5 unter der Kontrolle seines eigenen Promotors wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der Oligonukleotide E1As und E1Aas3 gewonnen. Als Matrize dienten die Plasmide pJF12 (12S-E1A) und pHIIG (13S-E1A). Ebenso wurde die Östrogenbindedomäne (ER) des menschlichen Östrogenrezeptors mit den Oligonukleotiden ERs und ERas und dem ES-HE14-Plasmid als Matrizen-DNA amplifiziert. Über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen Hind III (H III), Sal I und Asp 718 wurden die Fragmente in den pGKneo-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält das Neomycin-Resistenzgen (neo). Das resultierende Plasmid kodiert für das Fusionsprotein aus E1A und der Östrogenbindedomäne.

ER-Fusionsproteine reprimieren die TPA-Induktion der Kollagenase

Zur Kontrolle der Funktionalität der klonierten E1A-ER-Plasmide wurde die bekannte Fähigkeit von E1A ausgenutzt, die induzierte Expression der Kollagenase zu hemmen (van Dam *et al.*, 1990; Hagmeyer *et al.*, 1993). Es sollte daher zunächst überprüft werden, ob die E1A-ER-Fusionsproteine diese Hemmwirkung in Abhängigkeit von Östrogen ausüben. Logarithmisch wachsende WT56 Zellen (spontan immortalisierte, 3T3-ähnliche Maus-fibroblasten) wurden mit je 5 µg des jeweiligen ER-Konstruktes gemeinsam mit je 10 µg eines Kollagenase-CAT-Konstruktes (-73/+63CollCAT) transient kotransfiziert und

anschließend für zwölf Stunden in Medium mit 0.5% FCS inkubiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit Östrogen (1 μ M) induziert und nach 30 Minuten mit DMSO oder TPA (50 ng/ml, gelöst in DMSO) behandelt. 16 Stunden später wurde die CAT-Aktivität bestimmt.

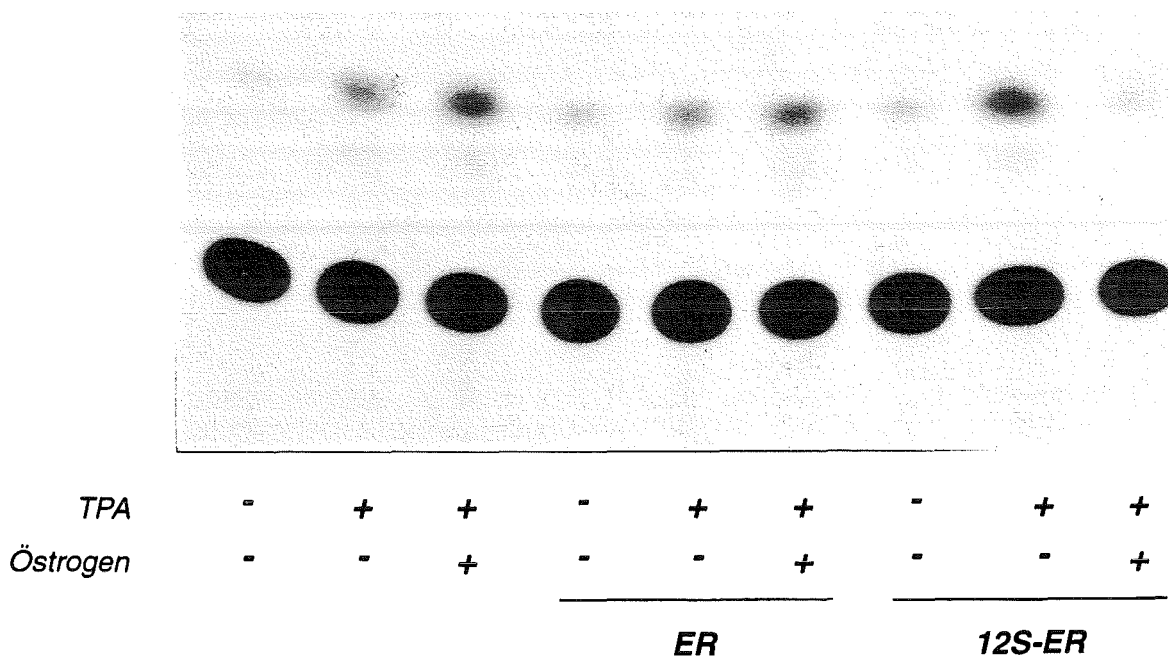


Abb. 12: E1A-ER-Fusionsproteine reprimieren östrogenabhängig die TPA-Induktion der Kollagenase

Logarithmisch wachsende, spontan immortalisierte Mausfibroblasten (WT56 Zellen) wurden pro Petrischale (9 cm) mit je 10 μ g des Reporterplasmids -73/+63CollCAT transient transfiziert. Zusätzlich wurden je 5 μ g des "leeren" pGK-neo oder des pGKneo-ER bzw. pGKneo-12ER-Expressionsplasmids kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für zwölf Stunden in Medium ohne FCS kultiviert und anschließend entweder nicht behandelt (-) oder mit 1 μ M Östrogen induziert und nach weiteren 30 min mit DMSO (-) oder TPA (50 ng/ml, gelöst in DMSO) behandelt. Nach zwölf Stunden wurden die Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt.

TPA-Behandlung allein führte zu einer Erhöhung der CAT-Aktivität, was die Aktivierung des Promotors des CAT-Konstruktes widerspiegelt. Zusätzliche Östrogen-Behandlung hatte auf diese Aktivierung keinen Einfluß. Das gleiche Ergebnis ließ sich beobachten, wenn zusätzlich zum CAT-Konstrukt das pGKneo-ER Plasmid (ohne E1A) kotransfiziert wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei Kotransfektion von pGKneo-12ER (oder pGKneo-

13ER, Daten nicht gezeigt) die Aktivierung durch TPA durch die zusätzliche Behandlung mit Östrogen vollständig gehemmt (Abb. 12).

Mit diesen Experimenten konnte ich nachweisen, daß die klonierten E1A-ER-Plasmide E1A-Effekte östrogenabhängig ausüben und für die nachfolgende stabile Transfektion geeignet sind.

Stabile Transfektion der E1A-ER-Konstrukte

Vor der stabilen Transfektion mußte außerdem sichergestellt werden, daß die verwendeten Zellen keinen endogenen Östrogenrezeptor exprimieren. Dazu wurde ein CAT-Indikatorgen (pBI CAT37) unter der Kontrolle eines Promotors, der durch den aktivierten Östrogenrezeptor induzierbar ist, in die Zelllinie WT56 transient transfiziert. Parallel dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen eines Expressionsplasmids (pKCK₂ ER), das für den Östrogenrezeptor kodiert, kotransfiziert. Nach der Transfektion blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit Östrogen (1 µM) induziert.

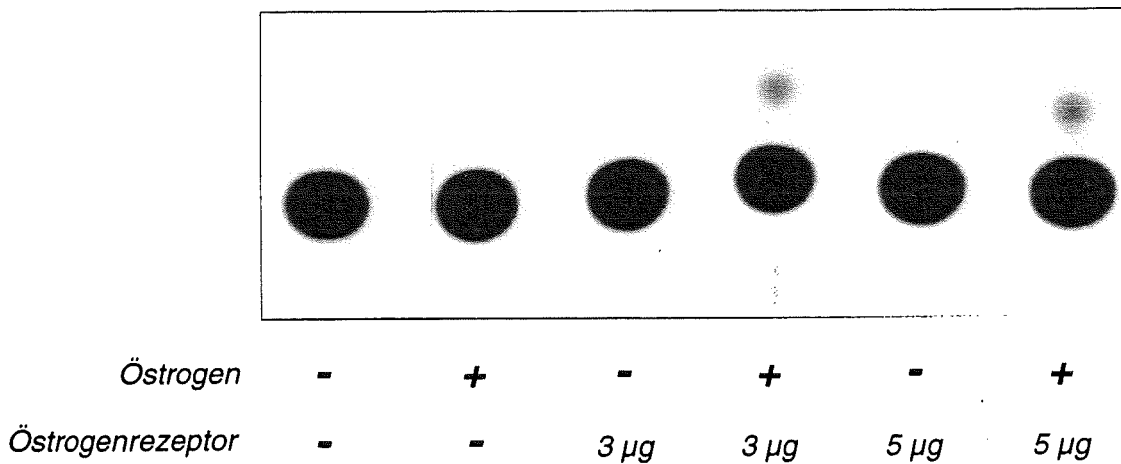


Abb. 13: Die Zelllinie WT56 exprimiert keinen endogenen Östrogenrezeptor

Logarithmisch wachsende Mausfibroblasten (WT56) wurden mit je 10 µg eines CAT-Indikatorgens (pBI CAT37) unter der Kontrolle eines Promotors, der durch den aktivierten Östrogenrezeptor induzierbar ist, transient transfiziert. Parallel dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen (3 und 5 µg) eines Expressionsplasmids (pKCK₂ ER), das für den Östrogenrezeptor kodiert, kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zwölf Stunden lang in Medium ohne FCS "gehungert" und anschließend entweder nicht behandelt (-) oder mit 1 µM Östrogen induziert. Nach 16 h wurden die Zellextrakte präpariert und die Aktivität des CAT-Reporterenzym bestimmt.

Die Analyse der CAT-Aktivität zeigte, daß der Promotor nur durch die Expression des exogenen Östrogenrezeptors durch Östrogen aktivierbar ist (Abb. 13). Die fehlende CAT-Aktivität in den Zellen ohne exogenen Östrogenrezeptor (Spur 1 und 2, Abb. 13) beweist, daß diese Mausfibroblasten-Zelllinie keinen endogenen Östrogenrezeptor exprimiert und somit für die stabile Transfektion verwendet werden konnte.

Mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode wurden jeweils 10^6 WT56-Fibroblasten mit je 5 µg pGKneo-12ER bzw. pGKneo-13ER transfiziert. Nach 48 Stunden wurde mit der Selektion mit G418 im Medium begonnen.

In beiden Ansätzen wurden jeweils 10-15 Klone erhalten, welche anschließend im Western Blot mit Hilfe des E1A-spezifischen polyklonalen Antikörper M37 auf die Expression des Fusionsproteins getestet wurden.

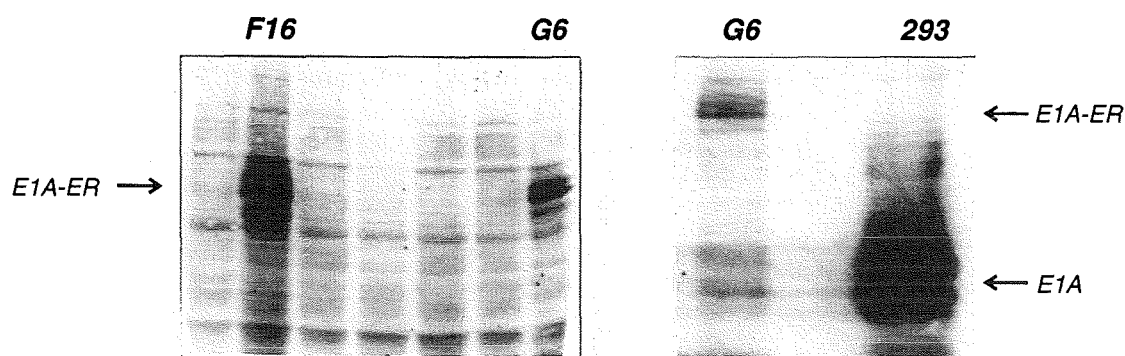


Abb. 14: Expression des E1A-ER-Fusionsproteins in den stabil transfizierten Klonen G6-ER und F16-ER

Menschliche 293 Zellen und acht verschiedene, stabil transfizierte Klone wurden unbehandelt direkt in 2xProbenpuffer lysiert. Je 30 µg dieser Proteinextrakte wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot). Die Membran wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen E1A (M37) hybridisiert und spezifisch gebundene Antikörper durch die "enhanced Chemolumineszenz" (ECL) Methode sichtbar gemacht.

Bei nur zwei Klonen (G6ER und F16ER), transfiziert mit dem Plasmid pGKneo-13ER, konnte die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abb. 14). Als positive Kontrolle wurde parallel dazu Gesamtzellextrakt von 293 Zellen (HEK 293 = "human embryonic kidney" Zellen) untersucht. 293 Zellen sind Adenovirus-transformierte, menschliche, embryonale Nierenzellen, welche E1A in der logarithmischen

Wachstumsphase konstitutiv exprimieren. In dieser Gelspur erkennt man multiple Formen des Wildtyp-E1A, was auf zahlreiche posttranslationale Modifikationen, v.a. Phosphorylierungen an Serinresten, zurückzuführen ist (Harlow *et al.*, 1985). Diese Formen haben ein Molekulargewicht zwischen 36 und 40 kD. In den Klonen G6ER und F16ER wurde E1A als Fusionsprotein mit der Östrogenbindedomäne exprimiert. Dadurch vergrößerte sich das Molekulargewicht um etwa 45 kD, erkennbar am langsameren Laufverhalten des Fusionsproteins in der Gelelektrophorese.

In den Zellklonen G6ER und F16ER läßt sich keine Östrogen-abhängige JNK/SAPK-Aktivierung feststellen

Die Östrogen-induzierbaren Klone sollten dazu dienen, die in dem Cadmium-induzierbaren MT-3 Zellklon beobachtete JNK/SAPK-Aktivierung mit einem anderen Induktor zu reproduzieren. Darüber hinaus sollte die Kinetik und die Proteinsynthese-Abhängigkeit dieser Induktion geprüft werden.

Um eine Aussage über die genaue Induktionskinetik machen zu können, wurden die Zellklone unterschiedlich lang, von 10 Minuten bis 24 Stunden, mit Östrogen (1 μ M, gelöst in DMSO) bzw. DMSO behandelt. Aus jeweils gleichen Mengen Proteinextrakt wurden JNK/SAPKs mit Hilfe polyklonaler Antikörper präzipitiert und ihre Aktivität im Immunkomplex-Kinase-Assay gemessen. Sowohl für den G6ER- als auch für den F16ER-Zellklon konnte in wiederholten Versuchen keine östrogenabhängige, signifikante JNK/SAPK-Aktivierung gemessen werden. In den gleichen Zelllinien bewirkte jedoch UV-Bestrahlung eine deutliche Aktivierung nach einer halben Stunde (Daten nicht gezeigt). Auch in einer transienten Transfektion der E1A-ER-Plasmide gemeinsam mit einer Epitop-markierten, exogenen JNK/SAPK konnte keine östrogenabhängige Aktivierung nachgewiesen werden. Ebenso konnte ein *c-jun*-Promotor-CAT-Konstrukt nicht östrogenabhängig induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse bezüglich der JNK/SAPK-Aktivierung durch E1A in den zwei verschiedenen Zellsystemen weisen eine deutliche Diskrepanz auf. Eine Möglichkeit der Ursache dieser Diskrepanz sind zelluläre Komponenten in der MT-3 Zelllinie, die durch die Cadmium-Behandlung induziert oder aktiviert werden. So ist denkbar, daß sowohl E1A Expression als auch Cadmium (in der verwendeten, geringen Dosis) alleine nicht zu einer

effizienten Induktion der Kinasen ausreichen. Dies würde die Nichtaktivierung der JNK/SAPKs durch Östrogen im G6ER-Zellklon und durch Cadmium in der Kontrollzelle GM637 erklären. Kommen jedoch beide Signale zusammen, sind sie fähig JNK/SAPK zu aktivieren.

Um diese Hypothese zu testen wurde der Östrogen-induzierbare Zellklon G6ER sowohl mit Östrogen als auch mit Cadmium jeweils alleine oder in Kombination behandelt, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion geerntet und die Aktivität der JNK/SAPKs im Immunkomplex-Kinase-Assay gemessen.

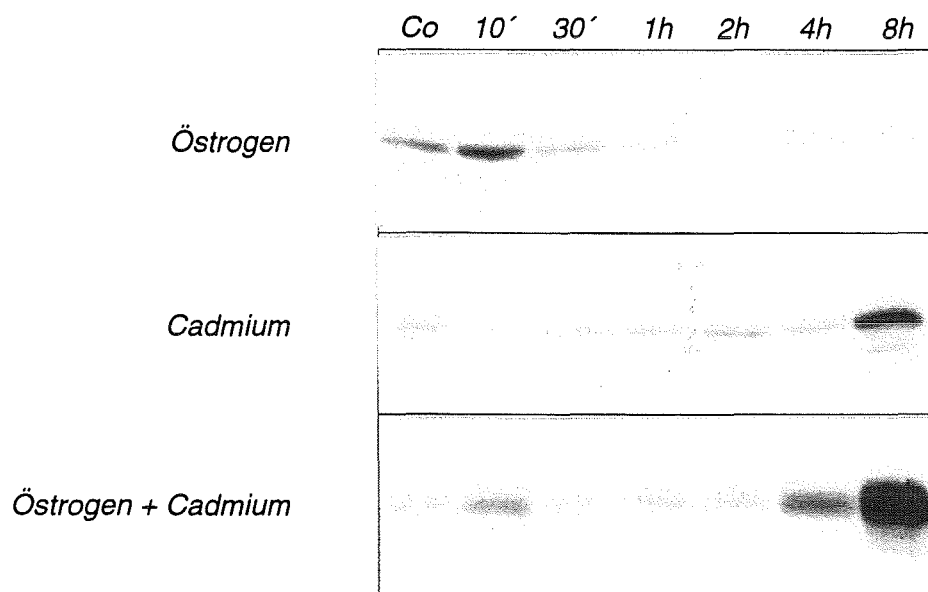


Abb. 15: E1A und Cadmium kooperieren bei der JNK/SAPK-Aktivierung

Zellen des stabil transfizierten Zellklons G6-ER blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit 1 μ M Östrogen (oberes Gel), 3 μ M Cadmiumchlorid (mittleres Gel) oder 1 μ M Östrogen und 3 μ M Cadmiumchlorid (unteres Gel) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. JNK/SAPKs wurden aus gleichen Proteinmengen mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-Jun und [γ - 32 P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Cadmium-Behandlung der Zellen führte zu einer schwachen Induktion der JNK/SAPKs nach acht Stunden (Abb. 15, mittleres Gel), Östrogen alleine nach 10 Minuten (Abb. 15, oberes Gel). Wurden die Zellen jedoch mit beiden Induktoren gleichzeitig behandelt, konnte man eine starke JNK/SAPK-Aktivierung nach acht Stunden erkennen (Abb. 15, unteres Gel). Demnach reicht die Expression von E1A alleine in diesen Zellen nicht aus, um diese Signaltransduktionswege effizient in Gang zu setzen. Dazu ist ein zweites Signal, in diesem Fall ausgelöst durch das Schwermetall Cadmium, notwendig.



Teil II: MMS-induzierte Signaltransduktion

Ähnlich wie UV-Strahlung und Expression des E1A-Onkoproteins bewirken auch alkylierende Substanzen, wie z.B. MMS (*Methylmethansulfonat*), die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun*-Gens (van Dam *et al.*, 1995). Diese alkylierende Agenzien sind die stärksten Induktoren, der bis jetzt untersuchten Stimuli. Durch Verwendung von GAL4-ATF-2- und GAL4-cJun-Fusionsproteine wurde nachgewiesen, daß die Transaktivierungsdomänen von ATF-2 und cJun Ziele der Signaltransduktionswege sind, die durch UV-Strahlung und alkylierende Agenzien induziert werden. Diese Stimuli bewirken eine Steigerung der Phosphorylierung innerhalb dieser Transaktivierungsdomänen (van Dam *et al.*, 1995).

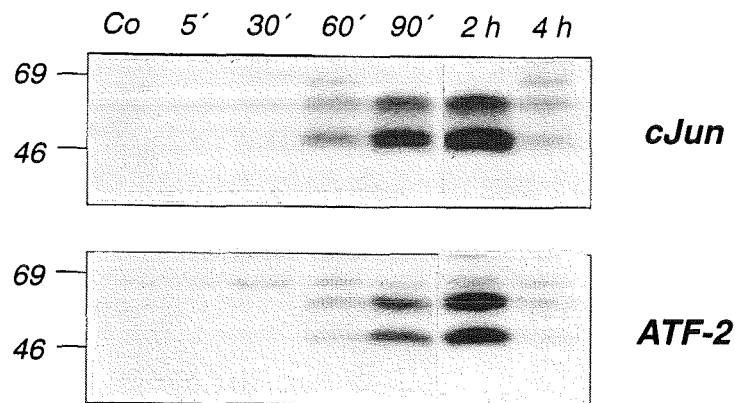
MMS aktiviert JNK/SAPKs

Auch hier stellte sich die Frage, welche zellulären Proteinkinasen durch MMS aktiviert werden und somit für diese Phosphorylierung verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Frage verwendete ich erneut den In-Gel-Kinase-Assay. Durch Behandlung von menschlichen 293 Zellen mit MMS (1 mM) wurden zwei Kinasen mit einem Molekulargewicht von etwa 46 und 54 kD aktiviert, die das Substrat GST-Jun im Gel phosphorylierten. Diese Aktivierung war nach einer Stunde erkennbar und erreichte nach zwei Stunden ein Maximum (Abb. 16A, oben). Das Laufverhalten dieser Proteinkinasen in der Gelelektrophorese deutete daraufhin, daß es sich auch in diesem Fall um JNK/SAPKs handelte.

Um aufzuklären, ob JNK/SAPKs tatsächlich durch MMS-Behandlung aktiviert werden, wurden menschliche 293 Zellen mit MMS (1 mM) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Als positive Kontrolle wurden parallel dazu 293 Zellen mit UV (40 J/m²) bestrahlt und nach 30 Minuten lysiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Aktivierung der JNK/SAPKs durch die UV-Bestrahlung maximal. Anschließend wurden die endogenen JNK/SAPKs mit Hilfe polyklonaler Antikörper aus den Zellextrakten präzipitiert und ihre Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun als Substrat bestimmt. In diesem Experiment

wurde deutlich, daß JNK/SAPKs durch MMS aktiviert werden, und daß MMS auch auf dieser Ebene ein stärkerer Induktor als UV-Strahlung ist (Abb. 16B).

A



B

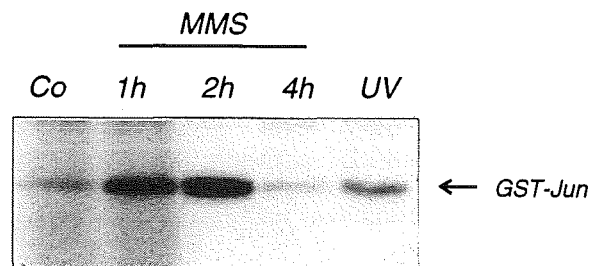


Abb. 16: Die alkylierende Substanz MMS aktiviert JNK/SAPKs

Menschliche 293 Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 1 mM MMS behandelt oder mit 40 J/m² UV bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen auf Eis lysiert. **A.** Mit jeweils gleichen Mengen Proteinextrakt wurde ein In-Gel-Kinase-Assay mit bakteriell exprimierten GST-Jun (oberes Gel) bzw. GST-ATF-2 (unteres Gel) durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie nach Exposition über Nacht. **B.** JNK/SAPKs wurden aus gleichen Proteinmengen mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-Jun und [γ -³²P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm 15 min lang exponiert.

JNK/SAPKs phosphorylieren ebenfalls ATF-2

Mit der Aktivierung der JNK/SAPKs und der Identifizierung des cJun Proteins als Substrat wurde einer der Partner des Dimers cJun/ATF-2 bestimmt, der für die Induktion des *c-jun*-Gens nach UV-Strahlung und alkylierenden Substanzen verantwortlich ist. Es stellte sich die Frage, ob die Aktivität von ATF-2 ebenfalls über JNK/SAPKs reguliert wird.

Dazu verwendete ich in einem In-Gel-Kinase-Assay mit MMS-behandelten 293 Zellen bakteriell exprimiertes GST-ATF-2-Fusionsprotein sowohl zur Vorreinigung der Extrakte als auch als Substrat im Gel. Auch in diesen Experimenten wurden zwei Proteinkinasen mit dem Molekulargewicht von etwa 46 und 54 kD aktiviert. Die Induktionskinetik und das Laufverhalten dieser Kinasen entsprachen dem der JNK/SAPKs, die mit GST-Jun im In-Gel-Kinase-Assay nachgewiesen worden waren (Abb. 16A, unten).

Die Übereinstimmung dieser zwei Ergebnisse ließ vermuten, daß cJun-assoziierte Kinasen auch ATF-2 phosphorylieren können und umgekehrt. Um diese Hypothese zu überprüfen, verwendete ich GST-Jun zum Vorreinigen der Extrakte (vor der Gelelektrophorese) und GST-ATF-2 als Substrat im Gel und umgekehrt.

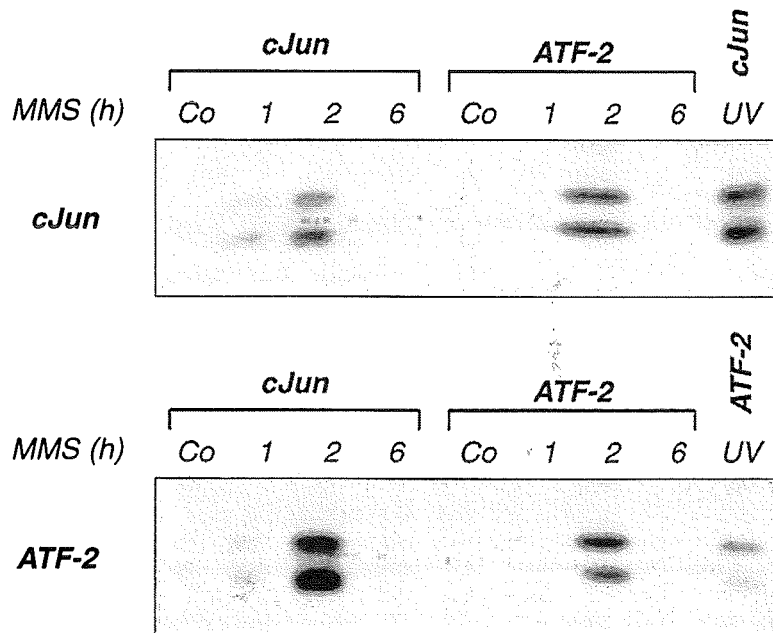


Abb. 17: MMS-aktivierte JNK/SAPKs phosphorylieren cJun und ATF-2

In-Gel-Kinase-Assay mit Zellextrakten aus nicht (Co) oder unterschiedlich lange (Angaben in Stunden) mit 1 mM MMS behandelten oder mit 40 J/m^2 UV bestrahlten (geerntet 30 min nach der Bestrahlung) 293 Zellen. Zur Vorreinigung der Extrakte wurde je $40 \mu\text{g}$ GST-Jun bzw. GST-ATF-2 (über der Abbildung gekennzeichnet) und als Substrat im Gel je $130 \mu\text{g/ml}$ GST-Jun bzw. GST-ATF-2 (links der Abb. gekennzeichnet) verwendet. Die Abbildung zeigt die über Nacht exponierten Autoradiographien.

Hierbei wurde deutlich, daß sowohl cJun-spezifische Kinasen mit der gleichen Kapazität ATF-2 phosphorylieren können wie auch ATF-2-spezifische Kinasen cJun (Abb. 17). Diese Fähigkeit der Proteinkinasen, beide Heterodimer-Partner reziprok zu phosphorylieren, könnte die volle Aktivierung ihrer Transaktivierungsfunktion als Antwort auf externe Stimuli garantieren.

Den Nachweis, daß es sich bei den ATF-2-Kinasen tatsächlich um JNK/SAPKs handelt, lieferte die Reinigung der Proteine, die ATF-2 binden können. Dafür wurden 293 Zellen mit UV bestrahlt bzw. mit MMS behandelt und nach 30 Minuten bzw. zwei Stunden geerntet. Entsprechend dem ersten Schritt im In-Gel-Kinase-Assay wurden die Proteinextrakte mit bakteriell exprimiertem GST-ATF-2 und parallel dazu mit GST-Jun, gekoppelt an GSH-Agarose als Säulenmaterial, inkubiert. Assoziierte Proteine wurden schrittweise mit 2 M Harnstoff von der Säule eluiert. Die einzelne Fraktionen wurden in einer *In-vitro*-Phosphorylierung auf ihre Kinaseaktivität getestet. Der Hauptanteil der Kinaseaktivität war im Eluat der Fraktionen zwei und drei enthalten (Abb. 18A).

Allein aufgrund der Fähigkeit dieser gereinigten Kinaseaktivität, GST-cJun bzw. GST-ATF-2 *in vitro* zu phosphorylieren, läßt sich keine Aussage darüber machen, ob diese Phosphorylierungen auch an funktionell relevanten Aminosäuren stattfinden. Essentiell für die Aktivierung des cJun-Proteins durch UV-Strahlung und MMS-Behandlung sind die Phosphorylierungen der Serine an den Positionen 63 und 73 und des Threonins an Position 91 (zur Übersicht siehe: Karin und Smeal, 1992; Sachsenmaier und Radler-Pohl, 1994; Papavassiliou *et al.*, 1995). Diesen entsprechen den Threoninen an den Positionen 69 und 71 und dem Serin an der Position 90 in der Transaktivierungsdomäne des ATF-2-Proteins (van Dam *et al.*, 1995). Durch Aufreinigung entsprechender mutierter, bakterieller GST-Proteine, bei denen diese Aminosäuren durch die nicht-phosphorylierbare Aminosäure Alanin ausgetauscht waren, konnte die Spezifität der gereinigten Kinaseaktivität getestet werden. Die *In-vitro*-Phosphorylierung erfolgte mit je einem Aliquot der Fraktionen zwei, drei und acht der ATF-2-assozierten Kinasen. Als Substrat diente Wildtyp- (W) und mutiertes (M) GST-Jun (Abb. 18B, linkes Gel) bzw. Wildtyp- und mutiertes GST-ATF-2 (Abb. 18B, rechtes Gel). Zusätzlich wurden die beiden GST-ATF-2-Fusionsproteine mit einem Aliquot der Fraktion zwei der GST-Jun-assozierten Kinasen (JNK) phosphoryliert.

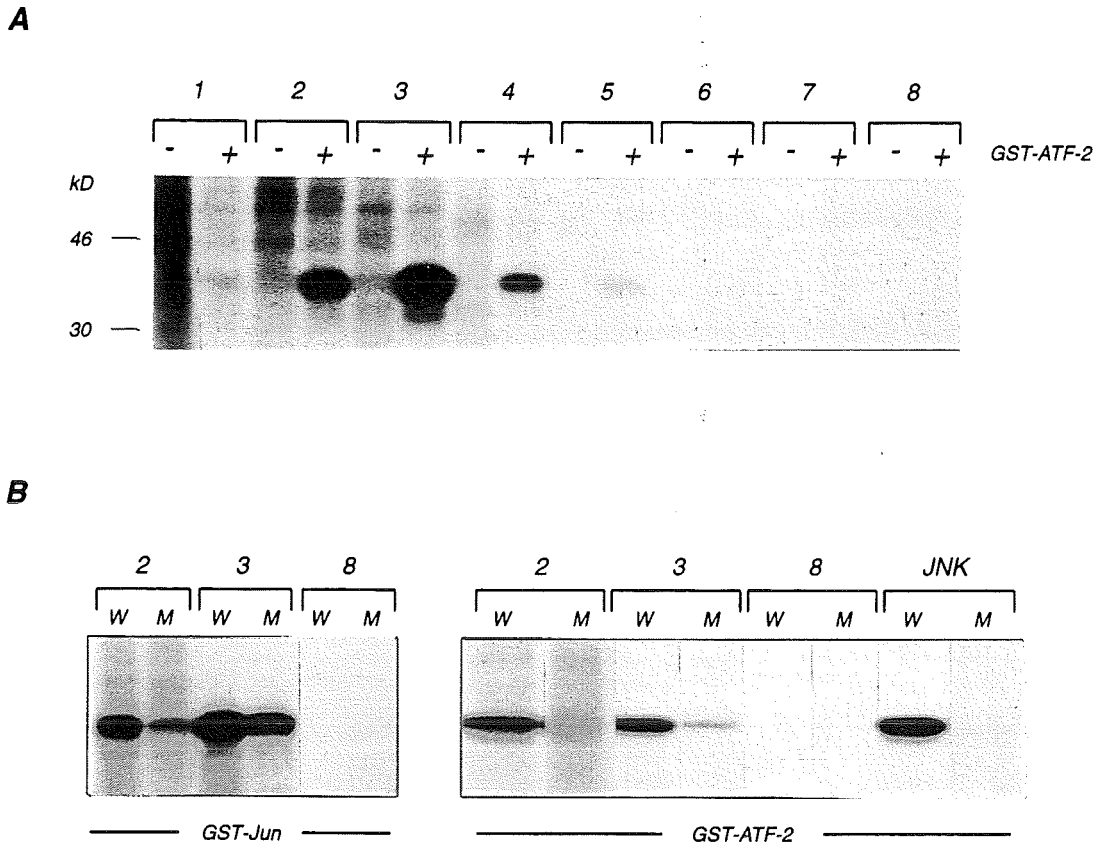


Abb. 18: Reinigung ATF-2-spezifischer Kinasen

A. Proteinextrakt aus 293 Zellen, der 30 min nach UV-Bestrahlung (40 J/m^2) präpariert wurde, wurde mit bakteriell exprimiertem GST-ATF-2 inkubiert, das an GSH-Agarose als Säulenmaterial gekoppelt war. Nach dreimaligem Waschen der Säule wurden ATF-2-assoziierte Proteine mit 2 M (Fraktion 1-6) bzw. 3 M (Fraktion 7 und 8) Harnstoff in 400 μl -Fraktionen eluiert. 2 μl jeder Fraktion wurde in einer *In-vitro*-Phosphorylierung ohne (-) oder mit (+) GST-ATF-2 als Substrat und je 5 μCi [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP auf ihre Kinaseaktivität getestet. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt.

B. Je 2 μl der verschiedenen Fraktionen (über der Abbildung gekennzeichnet) der gereinigten ATF-2-Kinase-Aktivität bzw. der cJun-Kinase-Aktivität (JNK) wurden in einer *In-vitro*-Phosphorylierung mit bakteriell exprimiertem GST-Jun bzw. GST-ATF-2 (unter der Abbildung gekennzeichnet), jeweils Wildtyp (W) oder mutiertes (M; für Jun: Serin 63 und 73; für ATF-2: Threonin 69 und 71 und Serin 90) Protein als Substrat und je 5 μCi [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP getestet. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt.

Fraktion acht enthält, wie erwartet, keine Kinase-Aktivität. Im Gegensatz dazu wurden beide Wildtyp-Fusionsproteine sowohl von Fraktion zwei und drei der ATF-2-assoziierten Kinasen als auch durch die Jun-assoziierten Kinasen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung war im Falle des mutierten GST-Jun reduziert und im Falle des mutierten GST-ATF-2 fast vollständig aufgehoben (Abb. 18B). Die noch vorhandene

Phosphorylierung der Jun-Mutante war vermutlich auf die Phosphorylierung der Threonine an den Positionen 91, 93 und/oder 95 zurückzuführen. Für diese Aminosäuren ist beschrieben worden, daß sie *in vitro* durch JNK/SAPKs phosphoryliert werden können (Hibi *et al.*, 1993; Derijard *et al.*, 1994).

Zum Nachweis, daß in den gereinigten Kinase-Fractionen JNK/SAPKs enthalten sind, wurde je ein Aliquot in einem Western Blot mit JNK1-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 19).

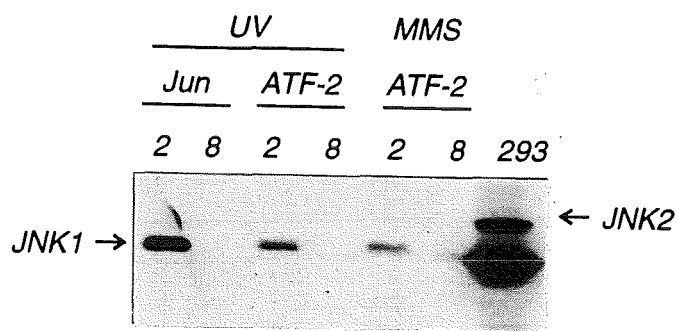


Abb. 19: Die gereinigten Fraktionen mit Kinase-Aktivität enthalten JNK/SAPKs.

Je 10 µl der verschiedenen Fraktionen (Zahlen über dem Gel) wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot). Die Membran wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen JNK1 (C-17, Santa Cruz) hybridisiert und spezifisch gebundene Antikörper durch die "enhanced Chemolumineszenz" (ECL) Methode sichtbar gemacht.

- Spur 1: Jun-gereinigte, Kinase-positive Fraktion-Nr.2 aus UV-bestrahlten 293 Zellen
 2: Jun-gereinigte, Kinase-negative Fraktion-Nr.8 aus UV-bestrahlten 293 Zellen
 3: ATF-2-gereinigte, Kinase-positive Fraktion-Nr.2 aus UV-bestrahlten 293 Zellen
 4: ATF-2-gereinigte, Kinase-negative Fraktion-Nr.8 aus UV-bestrahlten 293 Zellen
 5: ATF-2-gereinigte, Kinase-positive Fraktion-Nr.2 aus MMS-behandelten 293 Zellen
 6: ATF-2-gereinigte, Kinase-negative Fraktion-Nr.8 aus MMS-behandelten 293 Zellen
 7: 293-Gesamtzellextrakt, unbehandelt

In den ersten zwei Gelspuren wurden die Proteine aufgetragen, welche nach UV-Induktion an GST-cJun binden: in der ersten Spur ein Aliquot aus Fraktion zwei (mit Kinase-Aktivität) und in der zweiten Spur ein Aliquot aus Fraktion acht (ohne Kinase-Aktivität). Entsprechend wurden in Gelspur drei und vier bzw. fünf und sechs jeweils Fraktion zwei und acht der Proteine aufgetragen, die nach UV-Bestrahlung bzw. nach MMS-Behandlung

mit ATF-2 assoziiert waren. Als positive Kontrolle diente in der letzten Gelspur ein Gesamtzellextrakt aus unbehandelten 293 Zellen. In allen Kinase-positiven Fraktionen und im Gesamtzellextrakt ließ sich JNK1 deutlich nachweisen, während in den Kinase-negativen Fraktionen keine detektierbare JNK1 enthalten war. Nach den Ergebnissen des In-Gel-Kinase-Assays sollte auch JNK2 in den Kinase-positiven Fraktionen vorhanden sein. Da der verwendete Antikörper jedoch JNK1-spezifisch ist und nur sehr schwach mit JNK2 kreuzhybridisiert, kann JNK2 nur bei sehr großen Proteinmengen im Western Blot nachgewiesen werden. Dies wurde in Gelspur sieben erkennbar, in der eine sehr viel größere Proteinmenge aufgetragen worden war.

Die JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS ist konzentrationsabhängig

Die bisher in den Experimenten verwendete MMS-Konzentration (1 mM) bewirkte ein Absterben der Zellen nach etwa acht bis zwölf Stunden. Zur Untersuchung der Korrelation zwischen toxischer Wirkung und Aktivierung von JNK/SAPKs wurden 293 Zellen für jeweils zwei Stunden mit unterschiedlichen MMS-Konzentrationen behandelt. Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper präzipitiert, und ihre Aktivität im Immunkomplex-Kinase-Assay bestimmt.

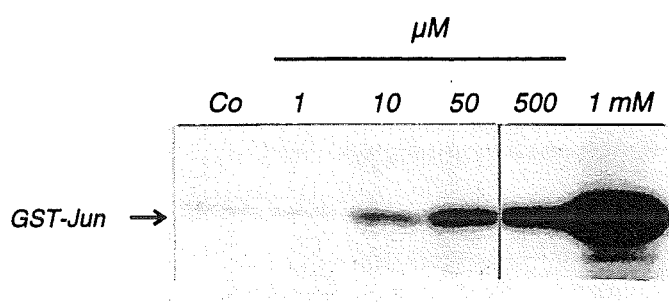


Abb. 20: JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS ist dosisabhängig

Menschliche 293 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen MMS jeweils zwei Stunden lang behandelt und auf Eis lysiert. Endogene JNK/SAPKs wurden aus gleichen Proteinmengen mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-Jun und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Anhand der Phosphorylierung des GST-Jun-Substrates war zu erkennen, daß die Stärke der JNK/SAPK-Aktivierung von der eingesetzten MMS-Dosis abhängig war (Abb. 20). Sie war auch bei Konzentrationen erkennbar, die noch keine toxische Wirkung auf die Zellen ausüben (< 50 mM, persönliche Mitteilung, A. Kolbus, DKFZ Heidelberg). Die JNK/SAPK-Aktivierung ist demnach keine Folge des Absterbens der Zellen.

JNK/SAPKs werden nur von bestimmten alkylierenden Substanzen aktiviert

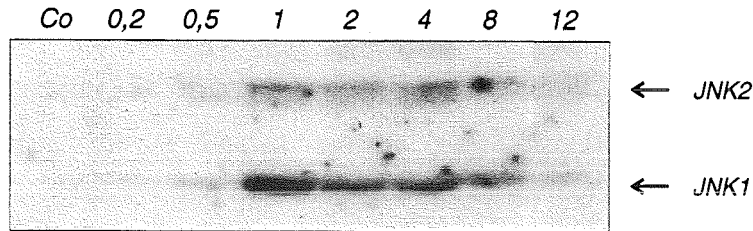
Monofunktionale Agenzien unterscheiden sich in ihrer elektrophilen Stärke und in ihren biochemischen und biologischen Eigenschaften. Auf der einen Seite steht MMS und z.B. MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin), die vor allem mit dem Ringstickstoff in Purinbasen (v.a. N-7 des Guanins) reagieren (Beranek *et al.*, 1980). Das Auslösen dieser Modifikationen korreliert mit der Induktion von Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustauschen und Zelltod (Natarajan *et al.*, 1984). Nur etwa 0,3% aller Alkylierungsprodukte sind O⁶-Methylguanine. Diese Läsion ist hauptverantwortlich für Mutagenese und maligne Transformation. Im Gegensatz dazu sind ungefähr 9% der DNA-Schäden nach ENU- (Ethylnitrosoharnstoff, "ethylnitrosourea") Behandlung O⁶-Ethylguanine. Damit ist ENU die mutagenste und karzinogenste, monofunktionale, alkylierende Substanz.

Die Frage war, ob die beobachtete JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS für jede alkylierende Substanz allgemein gültig ist. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich sowohl MNNG als auch ENU auf ihre Fähigkeit hin getestet, JNK/SAPKs zu aktivieren.

Die Behandlung von menschlichen 293 Zellen mit MNNG (70 µM) und anschließender Analyse im In-Gel-Kinase-Assay ergab, daß MNNG, ebenso wie MMS, JNK/SAPKs aktiviert. Diese Aktivierung erreichte schon nach einer Stunde ein Maximum, nahm dann jedoch langsamer ab als nach der Aktivierung durch MMS. Auch nach zwölf Stunden war noch eine geringe JNK/SAPK-Aktivität erkennbar (Abb. 21A).

Im Gegensatz dazu konnte ich mit Hilfe des Immunkomplex-Kinase-Assays innerhalb acht Stunden nach Induktion mit 1 mM ENU, einer Konzentration die in kultivierten Säugetierzellen mutagen wirkt (Shibuya und Morimoto, 1993), keine JNK/SAPK-Aktivierung nachweisen (Daten nicht gezeigt). Auch die Verwendung einer 10-fach höheren Dosis (10 mM), die ein Absterben der Zellen innerhalb drei Stunden verursachte, hatte keinen Einfluß auf die JNK/SAPK-Aktivität (Abb. 21B).

A



B

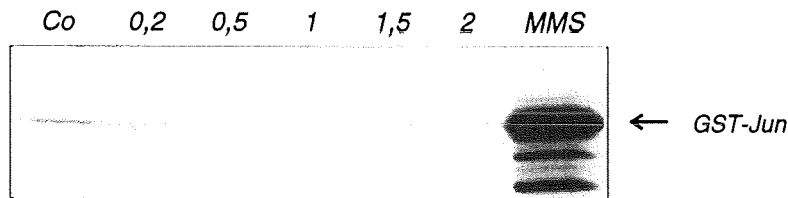


Abb. 21: JNK/SAPKs werden durch MNNG- jedoch nicht durch ENU-Behandlung aktiviert

A. Menschliche 293 Zellen wurden entweder nicht (Co) oder mit 70 μM MNNG behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) auf Eis lysiert. Mit jeweils gleichen Proteinmengen wurde ein In-Gel-Kinase-Assay mit bakteriell exprimiertem GST-Jun und [γ - ^{32}P]ATP als Substrat durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie nach Exposition über Nacht.

B. Menschliche 293 Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit 1 mM MMS für zwei Stunden (MMS) bzw. mit 10 mM ENU behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) geerntet. Endogene JNK/SAPKs wurden aus gleichen Proteinmengen mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-Jun und [γ - ^{32}P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die Aktivierung der Streßantwort in den verwendeten Zellen von der Art der verwendeten alkylierenden Substanz abhängig ist. Nur Agenzien wie MMS und MNNG, die aufgrund ihrer Elektrophilie vor allem mit dem Ringstickstoff der Purinbasen reagieren, sind wirksame Aktivatoren des JNK/SAPK-Signaltransduktions-

weges. Sie reagieren über einen S_N2 -Mechanismus. Dies bedeutet, daß beide Reaktionspartner am Primärschritt beteiligt sind. Er verläuft bimolekular, so daß intermediär ein Übergangszustand eingenommen wird. Im Gegensatz dazu alkyliert ENU über einen anderen chemischen Reaktionsmechanismus (S_N1), bei dem der geschwindigkeitsbestimmende Primärschritt monomolekular verläuft und intermediär ein reaktives Carbeniumion gebildet wird. ENU erzeugt dadurch ein völlig anderes Spektrum an Alkylierungsprodukten und ist nicht in der Lage, die JNK/SAPK-Aktivität zu steigern.

MMS induziert Proteinkinasen-Kaskaden

Ebenso wie bei der Induktion von JNK/SAPKs durch E1A stellte sich die Frage nach der Selektivität der Induktion. Werden, wie z.B. nach UV-Bestrahlung, alle Mitglieder der MAP-Kinase Familie aktiviert (Pulverer *et al.*, 1991; Hibi *et al.* 1993; Kyriakis *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994) oder beschränkt sich der Einfluß auf einen bestimmten Signaltransduktionsweg?

Zunächst wurde die Aktivität von ERK1 und ERK2 wie bereits zuvor bei der Analyse von E1A mit Hilfe der Western Blot Analyse bestimmt. Als positive Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit EGF, was zu einer Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 an Threonin- und Tyrosinresten führte. Diese Phosphorylierung war an dem daraus resultierenden, retardierten Laufverhalten bei der Gelelektrophorese erkennbar. Im Gegensatz zu EGF führte die MMS-Behandlung innerhalb der untersuchten vier Stunden nicht zur Aktivierung von ERK1 und 2 (Abb. 22A).

Zur Untersuchung der p38-MAP-Kinase wurden logarithmisch wachsende 293 Zellen transient mit einem Expressionsvektor transfiziert. Dieser Vektor kodiert für eine Epitop-markierte (Flag) p38-MAP-Kinase. Zwölf Stunden später wurden die Zellen mit MMS (1 mM) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion geerntet. Die exogene p38-MAP-Kinase wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die gegen das Flag-Epitop gerichtet waren, präzipitiert. Anschließend wurde die Kinase-Aktivität im Immunkomplex-Kinase-Assay mit bakteriell exprimiertem GST-ATF-2 als Substrat bestimmt. Dabei wurde deutlich, daß p38-MAP-Kinase mit der gleichen Kinetik wie JNK/SAPKs durch MMS aktiviert wurde (Abb. 22B). Wie auch im Falle von E1A induzierte MMS spezifisch JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase. ERK1 und ERK2 wurden in ihrer Aktivität nicht verändert.

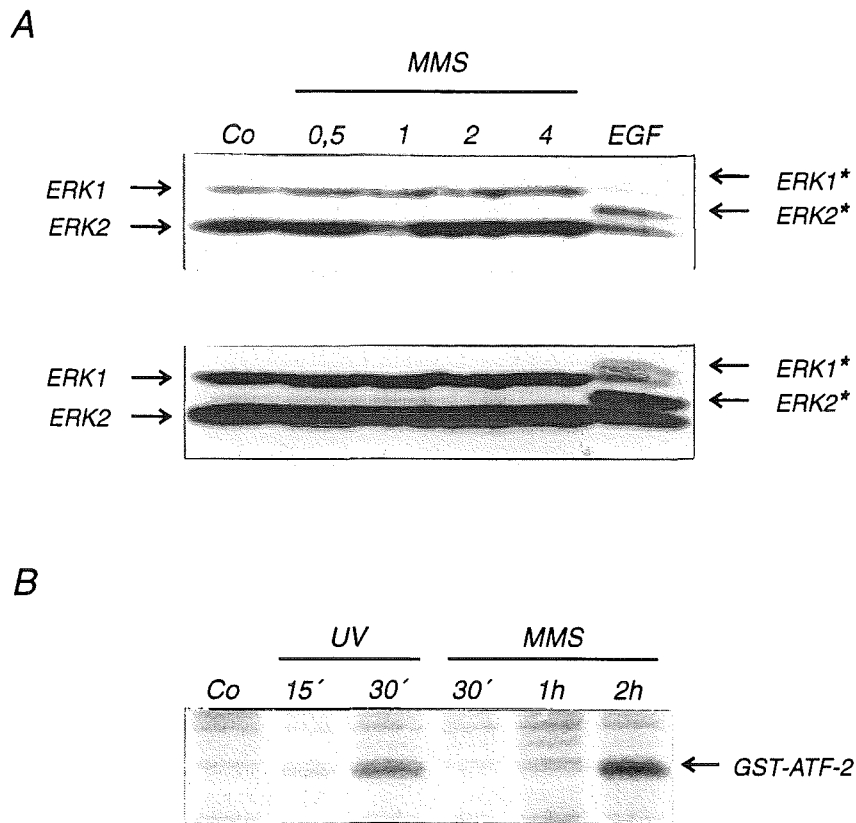


Abb. 22: MMS aktiviert p38-MAP-Kinase, aber nicht ERK1 und ERK2

A. Humane 293 Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit EGF (10 ng/ml) für 15 min bzw. mit MMS (1 mM) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten direkt in 2xProbenpuffer lysiert. Nach Auftrennung der Proteine in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden sie auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot). Zum Nachweis der MAP-Kinasen ERK1 und 2 wurde die Membran mit polyklonalen Antikörpern (ERK2, D-2, Santa Cruz) hybridisiert und spezifisch gebundene Antikörper durch die "enhanced Chemolumineszenz" (ECL) Methode sichtbar gemacht.

B. Logarithmisch wachsende 293 Zellen wurden pro Petrischale (9 cm) mit je 7 µg des Expressionsplasmids, das für die Flag-markierte p38-MAP-Kinase kodiert, transfiziert und 24 h später entweder nicht behandelt (Co) oder mit 40 J/m² UV bestrahlt bzw. mit 1 mM MMS behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen auf Eis geerntet, die exogene p38-MAP-Kinase mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Flag-probe, D-8, Santa Cruz) präzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-ATF-2 und [³²P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm sechs Stunden lang exponiert.

Da MMS sowohl JNK/SAPKs als auch p38-MAP-Kinase mit der gleichen Kinetik aktiviert, liegt die Vermutung nahe, daß auch ihr gemeinsamer Aktivator SEK1/MKK4 (Dérijard *et al.*, 1995) durch MMS induziert wird. Um dies zu überprüfen, wurden logarithmisch wachsende 293 Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für eine markierte (HA; Hämagglutinin) SEK1 kodiert und nach zwölf Stunden mit MMS (1 mM) behandelt. Anschließend wurde die exogene SEK1 mit Hilfe monoklonaler, HA-spezifischer Antikörper präzipitiert und ihre Aktivität im Immunkomplex-Kinase-Assay bestimmt. Als Substrat diente ein bakteriell exprimiertes GST-JNK/SAPK-Fusionsprotein.

Auch in diesem Fall war die Aktivierung anhand der verstärkten Phosphorylierung des Substrates zu erkennen (Abb. 23, links). Parallel dazu wurde im Western Blot nachgewiesen, daß die Menge an exprimiertem HA-SEK1 durch die MMS-Behandlung nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung des "stromaufwärts" gelegenen SEK1-Aktivators MEKK1 durch MMS wurde indirekt durch die Koexpression von HA-SEK1 und einer transdominant negative Form von MEKK1 (Δ MEKK1) bestimmt. Diese transdominant negative MEKK1 ist in ihrem aktiven Zentrum mutiert. Sie kann zwar noch Signale von "oben" empfangen, kann diese Signale aber nicht nach "unten" weiter übermitteln. Durch die Überexpression einer solchen Mutante wird damit der Signaltransduktionsweg auf dieser Ebene unterbrochen, und "stromabwärts" gelegene Kinasen werden nicht mehr aktiviert.

Menschliche 293 Zellen wurden transient mit den zwei Expressionsplasmiden, die für die HA-SEK1 und Δ MEKK1 kodieren, kotransfiziert. Nach zwölf Stunden wurden die Zellen mit MMS (1 mM) induziert und nach weiteren zwei Stunden lysiert. Die exogene HA-SEK1 wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die gegen das HA-Epitop gerichtet waren, immunpräzipitiert. Anschließend wurde ihre Aktivität im Immunkomplex mit bakteriell exprimiertem GST-JNK/SAPK-Fusionsprotein als Substrat bestimmt.

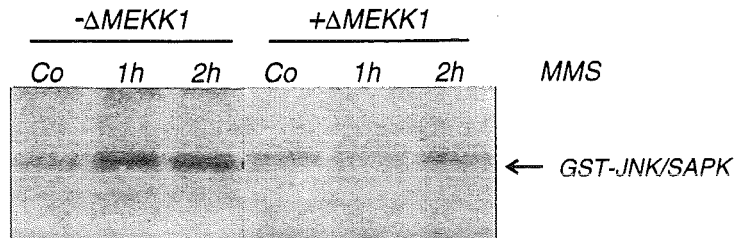


Abb. 23: Die MMS-Antwort beinhaltet die Aktivierung von SEK1 und MEKK1

Logarithmisch wachsende 293 Zellen wurden pro Petrischale (9 cm) mit je 2 μg des Expressionsvektors, der für die HA-markierte SEK1 kodiert, zusammen mit 10 μg eines "leeren" Vektors, pGKneo ($-\Delta\text{MEKK1}$) oder eines Expressionsvektors, der für die transdominant-negativ wirkende ΔMEKK1 ($+\Delta\text{MEKK1}$) kodiert, kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder nicht behandelt (Co) oder mit 1 mM MMS induziert und nach zwei Stunden geerntet. Die exogene SEK1 wurde mit Hilfe monoklonaler, gegen das HA-Epitop gerichteter Antikörper (Anti-HA, Boehringer Mannheim) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-JNK/SAPK und [γ - ^{32}P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Dabei wurde deutlich, daß die transdominant negative MEKK1 (ΔMEKK1) die Aktivierung von SEK1 durch MMS blockiert (Abb. 23, rechts). Die Expression von ΔMEKK1 alleine, ohne eine weitere Behandlung der Zellen, hatte keinen Einfluß auf die basale Aktivität von SEK1.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Aktivierung von JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase der Endpunkt eines Signaltransduktionsweges ist, der durch MMS induziert wird. Dieser Signalweg geht von MEKK1 aus, die SEK1 phosphoryliert und damit stimuliert. SEK1 wiederum aktiviert JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase durch Phosphorylierung. Die übergeordneten Kinasen, die die Aktivität von MEKK1 regulieren, sind bis jetzt noch unbekannt.

Die MMS-Antwort ist unabhängig von Signalen aus dem Kern

Nach Identifizierung des durch MMS induzierten Signaltransduktionsweges sollte der primären Angriffspunkt von MMS in der Zelle identifiziert werden. Welches initiale Ereignis zieht die Induktion dieser Streßantwort nach sich?

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die spezifische Initiation des Streß-Signaltransduktionsweges, der zur Aktivierung von JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase führt, von der elektrophilen Reaktionsfähigkeit der untersuchten alkylierenden Substanz und damit des produzierten, spezifischen Alkylierungsmuster in Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen, abhängig ist. Erst kürzlich wurde die Initiation dieses Signalweges mit DNA-Schäden in Zusammenhang gebracht, die durch Cis-Platinum und Mitomycin C verursacht wurden (Kharbanda *et al.*, 1995). Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, daß die JNK/SAPK-Aktivierung nach UV-Bestrahlung von dem verursachten DNA-Schaden unabhängig ist (Devary *et al.*, 1993).

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche zellulären Bestandteile essentielle Vermittler der zellulären Antwort auf MMS sind, habe ich zuerst die Rolle eines nukleären Signals untersucht, das durch Alkylierung genomischer DNA erzeugt wird. Die direkteste Methode dies zu untersuchen, ist die Messung der JNK/SAPK-Aktivität in Zellen ohne Zellkern, in sogenannten Zytoplasten. Dazu wurden murine Fibroblasten durch Zentrifugation der Zellkulturflaschen in Anwesenheit von Cytochalasin B entkernt. Cytochalasin B ist ein Pilzalkaloid, das in die Assoziation von Aktinfilamenten eingreift, indem es eines ihrer Enden blockiert. Durch die Auflösung des Zytoskeletts lassen sich die Zellkerne mit einer geringen Menge an Zytoplasma und umgeben von einem Teil der Zellmembran (= Karyoplast) aus adhärent wachsenden Zellen durch die Zentrifugation herauslösen. Nach der Zentrifugation wird das Karyoplastenpellet aus der Zellkulturflasche entfernt und neues Medium (ohne Cytochalasin B) zu den Zytoplasten gegeben. Durch das Auswaschen des Cytochalasin B kann sich das Zytoskelett wieder aufbauen und die Zytoplasten nehmen sehr schnell wieder ihre ursprüngliche Zellform an.

Die Effizienz der Entkernung wurde durch Färbung intakter Zellen und Zytoplasten mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (Hoechst 33528) kontrolliert. Wie in Abb. 24A zu sehen ist, wurden durch dieses Verfahren nahezu 100% der Zellen entkernt.

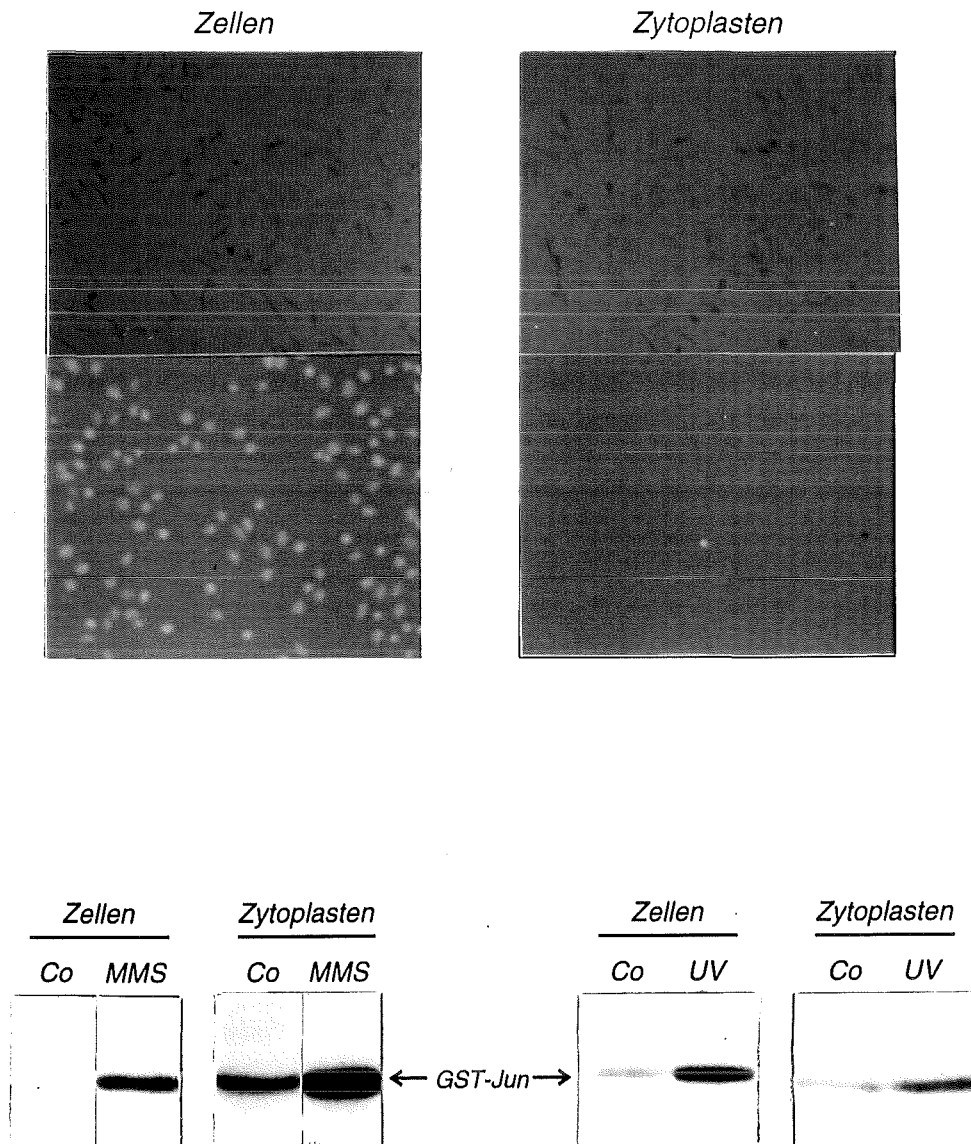


Abb. 24: JNK/SAPK-Aktivierung in Zytoplasten

Mausfibroblasten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit Cytochalasin B (19 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt und durch Zentrifugation entkernt. **A.** Intakte Zellen und Zytoplasten wurden mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33528) angefärbt und unter dem Mikroskop photographiert (freundlicherweise von K. Bender, FZ Karlsruhe durchgeführt). **B.** Intakte Zellen und Zytoplasten blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit 40 J/m^2 UV bestrahlt bzw. mit 1 mM MMS behandelt und nach 30 min (im Falle der UV-Bestrahlung) bzw. nach zwei Stunden (im Falle der MMS-Behandlung) geerntet. Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun und [γ -³²P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm 30 min lang exponiert.

16 Stunden nach der Entkernung blieben die Zytoplasten entweder unbehandelt oder wurden mit UV (40 J/m^2) bestrahlt bzw. mit MMS (1 mM) induziert und nach 30 Minuten bzw. zwei Stunden lysiert. Zur Kontrolle wurden parallel dazu intakte Zellen den gleichen Behandlungen unterworfen. Die JNK/SAPK-Aktivität wurde mit Hilfe des Immunkomplex-Kinase-Assays bestimmt. In den meisten Experimenten war, vermutlich aufgrund der Cytochalasin B-Behandlung, der basale Wert in den Zytoplasten erhöht. Trotzdem wurde deutlich, daß aufgrund der UV-Bestrahlung in Zellen ohne Kern JNK/SAPKs aktiviert wurden (Abb. 24B, rechts). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Devary *et al.*, 1993). In gleicher Weise induzierte auch MMS in Zytoplasten in jedem der durchgeführten Experimente JNK/SAPKs mit dem gleichen Aktivierungsfaktor wie in intakten Zellen (Abb. 24B, links).

Diese Ergebnisse schließen ein nukleäres Signal, das durch die Alkylierung von genomischer DNA initiiert wird, bei der Aktivierung von JNK/SAPKs durch MMS aus.

An der MMS-Antwort sind keine Zelloberflächen-Rezeptoren beteiligt

Neben der genomische DNA können auch die Zellmembran und Zelloberflächenrezeptoren die primären Signalauslöser sein, die zur Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges führen. Mögliche Rezeptoren, die durch MMS beeinflusst werden könnten, sind z.B. Rezeptoren für IL-1, $\text{TNF}\alpha$, EGF und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Für alle diese Rezeptoren ist beschrieben worden, daß sie in Signaltransduktionswege involviert sind, die zur Aktivierung von JNK/SAPKs führen (Kyriakis *et al.*, 1994; Minden *et al.*, 1994; Sluss *et al.*, 1994; Westwick *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995).

Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die den JNK/SAPK Signalweg initiieren, sind die muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (Coso *et al.*, 1995a, b). Die Signalweiterleitung vom Rezeptor zu "stromabwärts" gelegenen Komponenten erfolgt über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Diese Aktivierung kann fast vollständig durch die Expression von βARK aufgehoben werden. Dieses Protein bindet die, nach Aktivierung des Rezeptors, freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten und blockiert damit die Signalweiterleitung in den Kern (Crespo *et al.*, 1995).

Um zu untersuchen, ob MMS die zelluläre Antwort induziert indem es die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren imitiert, habe ich ein Zellsystem verwendet, bei dem Mausfibroblasten das βARK -Protein überexprimieren (freundlicherweise von A. Herrlich

zur Verfügung gestellt). Zur Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors wurde LPA ("lysophosphatidic acid"), ein mitogenes, Albumin-gebundenes Phospholipid, verwendet, das von aktivierten Blutplättchen freigesetzt wird (zur Übersicht siehe Jalink *et al.*, 1994; Moolenaar, 1995a, b). Behandlung der Zellen mit LPA aktivierte JNK/SAPKs innerhalb von 15 Minuten. Diese Aktivierung war in dem stabil transfizierten Zellklon, der das β ARK-Protein exprimiert, fast vollständig gehemmt. Im Unterschied dazu war die JNK/SAPK-Induktion durch MMS, UV-Bestrahlung und $\text{TNF}\alpha$ in diesem Zellklon, im Vergleich zur Induktion im Kontrollklon, nicht reduziert (Abb. 25).

Im Gegensatz zur LPA-Behandlung schließen diese Experimente die Beteiligung heterotrimerer G-Proteine bei der Signalübertragung nach MMS ebenso wie nach UV-Strahlung und $\text{TNF}\alpha$ aus.

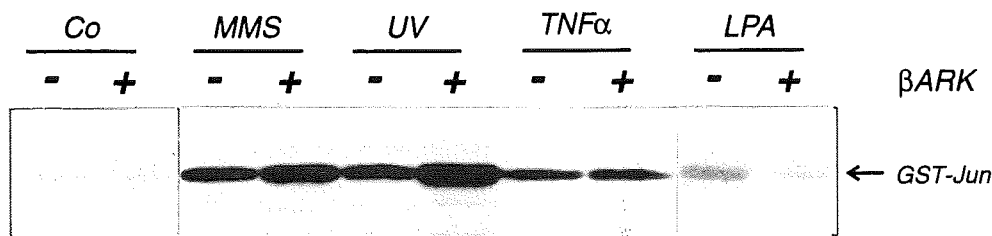


Abb. 25: MMS aktiviert keine G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Mausfibroblasten, die entweder nicht transfiziert (- β ARK) oder stabil mit einem Expressionsplasmid transfiziert worden waren, das für das β ARK-Protein kodiert (+ β ARK), blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden nach 2 h MMS- (1 mM), 15 min $\text{TNF}\alpha$ - (5 ng/ml), 15 min LPA- (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Behandlung bzw. 30 min nach UV-Bestrahlung (40 J/m^2) geerntet. Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie z.B. der EGF-Rezeptor ("epidermal growth factor") oder PDGF-Rezeptor ("platelet derived growth factor"), wurden als einer der primären Angriffspunkte von UV-Strahlung beschrieben (Sachsenmaier *et al.*, 1994, Knebel *et al.*, 1996). Um die direkte Beteiligung von Wachstumsfaktoren bei der UV-Antwort nachzuweisen, wurden die Effekte von Suramin untersucht, einem generellen Inhibitor für membranständige Rezeptoren (Betzholtz *et al.*, 1986; Huang und Huang, 1988; Yayon und Klagsbrun, 1990). Um die Frage zu beantworten, ob MMS und UV-Strahlung über die gleiche Primärkomponente - Aktivierung von Wachstumsfaktoren - wirken, wurde die JNK/SAPK-Aktivität nach UV-Strahlung und MMS-Behandlung in Ab- oder Anwesenheit von Suramin mittels In-Gel-Kinase-Assays bestimmt. Dazu wurden die Zellen vor der Induktion mit UV-Strahlung (40 J/m^2) oder MMS (1 mM) für 40 Minuten mit Suramin vorbehandelt.

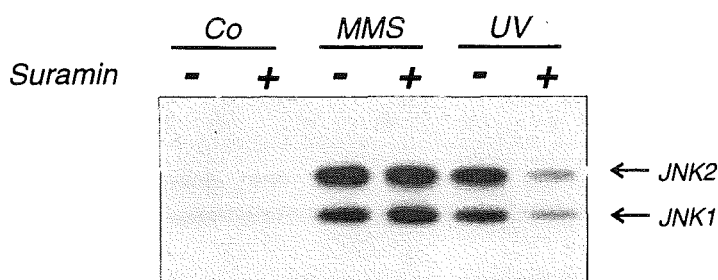


Abb. 26: MMS aktiviert keine Zelloberflächen-Rezeptoren

Menschliche 293 Zellen wurden in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von Suramin (0.3 mM) für 40 min kultiviert und dann entweder direkt geerntet (Co) oder zwei Stunden nach MMS-Behandlung (1 mM) bzw. 30 min nach UV-Bestrahlung (40 J/m^2) analysiert. Mit jeweils gleichen Mengen Proteinextrakt wurde ein In-Gel-Kinase-Assay mit bakteriell exprimiertem GST-Jun als Substrat im Gel durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie nach Exposition über Nacht.

Die Aktivierung von JNK/SAPKs durch UV-Strahlung wurde durch die Vorbehandlung der Zellen mit Suramin deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Induktion durch MMS nicht beeinflusst. Suramin alleine hatte keinen Effekt auf die Aktivität der Kinasen (Abb. 26).

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß UV-Strahlung und MMS unterschiedliche primäre Angriffspunkte besitzen, obwohl sie gleiche Signaltransduktionswege aktivieren.

Die MMS Antwort wird durch Glutathion und N-Acetylcystein gehemmt

Obleich der primäre Angriffspunkt von MMS, der die Aktivierung des JNK/SAPK-Weges vermittelt, bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte, gab es Hinweise auf zelluläre Komponenten, die eine Rolle bei der Modulation der Signalstärken spielen könnten.

Die Aktivierung der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP), ein Enzym der zellulären Reparaturmaschinerie, hat metabolische Konsequenzen. Insbesondere bewirkt sie den Verbrauch von NAD, was eine ATP Depletion nach sich zieht. Ein Inhibitor von PARP, 3-Aminobenzamid (ABA), der die Depletion von NAD und ATP blockieren kann, verhindert das Absterben von Zellen nach MMS-Behandlung (Mizumoto *et al.*, 1993). Desweiteren gibt es Hinweise, daß der intrazelluläre Glutathiongehalt, der Hauptregulator des Redoxzustandes der Zelle (zur Übersicht siehe: Meister, 1991), ein wichtiger Sensor für die Initiation der zellulären Antwort auf alkylierende Substanzen sein könnte. Glutathion (GSH) und andere Thiole spielen eine entscheidende Rolle bei der Detoxifikation von oxidativem Streß, der durch karzinogene Xenobiotika hervorgerufen wird (Chasseaud, 1979). Im Einklang damit korreliert ein erhöhter zellulärer Glutathionspiegel mit der erworbenen Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien (Britten *et al.*, 1992).

Um den Einfluß der PARP und von oxidativem Streß auf die JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS beurteilen zu können, wurde der Effekt untersucht, den eine Vorbehandlung von Zellen mit ABA, Glutathion oder N-Acetylcystein (NAC) verursacht. NAC wirkt zum einen direkt als Radikalfänger, zum anderen hebt es, als Vorläufer der Glutathion-Synthese, indirekt den Glutathiongehalt der Zelle (Aruoma *et al.*, 1989).

Menschliche 293 Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit NAC (15 mM), mit ABA (10 mM) oder mit GSH (15 mM) behandelt und nach zwei Stunden direkt geerntet (Gelspur 1-4) oder zusätzlich zwei Stunden lang mit MMS (1 mM) induziert (Gelspur 5-8).

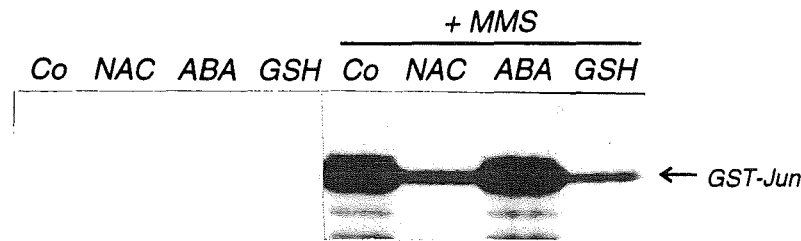


Abb. 27: JNK/SAPK-Aktivierung nach MMS wird durch Vorbehandlung mit GSH oder NAC gehemmt

293 Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden je 2 h mit NAC (15 mM), GSH (15 mM) oder ABA (10 mM) behandelt und anschließend direkt geerntet (Gelspur 1-4) oder mit 1 mM MMS induziert und nach weiteren zwei Stunden geerntet (Gelspur 5-8). Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

NAC-, ABA- oder GSH-Behandlung alleine hatte keine Auswirkung auf den basalen Aktivitätslevel der JNK/SAPKs (Abb. 27, links). Die Behandlung nur mit MMS führte zu der erwarteten JNK/SAPK-Aktivierung (Abb. 27, Spur 5). Diese Aktivierung wurde deutlich durch die Vorbehandlung der Zellen mit NAC bzw. GSH (Abb. 27, Spur 6 bzw. 8) gehemmt. Der PARP-Inhibitor ABA hingegen hatte keinen Einfluß (Abb. 27, Spur 7).

Zur weiteren Unterstützung dieser Ergebnisse habe ich anstelle der Erhöhung die Auswirkungen einer Reduktion des intrazellulären Gluthation-Spiegels analysiert. Eine fast vollständige Reduktion wird durch eine 24-stündige Behandlung von Zellen mit L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin (BSO) erreicht. BSO ist ein spezifischer Hemmstoff der γ -Glutamylcystein-Synthetase. Dieses Enzym ist verantwortlich für den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Biosynthese (Meister, 1991). Im Immunkomplex-Kinase-Assay wurde erkennbar, daß die GSH-Depletion keinen Einfluß auf die basale JNK/SAPK-Aktivität besaß und kaum die Kinetik der MMS-Induktion veränderte. Sie beeinflusste vielmehr die absolute Signalstärke: Aktivierung von JNK/SAPKs mit sub-

optimalen MMS-Konzentrationen (500 μ M, siehe auch Abb. 20) wurde durch die Vorbehandlung mit BSO drastisch gesteigert (Abb. 28).

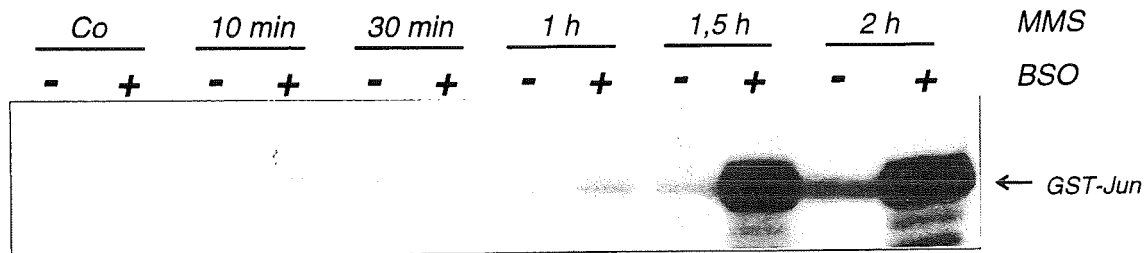


Abb. 28: JNK/SAPKs werden durch MMS in GSH-depletierten Zellen superinduziert

Humane 293 Zellen wurden entweder ohne (-) oder mit (+) 1 mM BSO für 24 h kultiviert, anschließend mit 0.5 mM MMS behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun und [γ - 32 P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Diese Befunde machen deutlich, daß der intrazelluläre GSH-Spiegel bei der Auslösung der Streß-Signalkaskade durch MMS ein entscheidender Parameter ist.

Dieser Effekt könnte spezifisch für alkylierende Substanzen sein, oder darauf beruhen, daß GSH direkt die Aktivität der Kinasen moduliert, so daß eine Anhebung des GSH-Gehaltes sämtliche Induktoren der JNK/SAPKs hemmt. Um dies zu klären, habe ich im Immunkomplex-Kinase-Assay den Einfluß der GSH- oder NAC-Vorbehandlung auf die JNK/SAPK-Aktivierung durch UV-Bestrahlung, MMS- und TNF α -Behandlung untersucht.

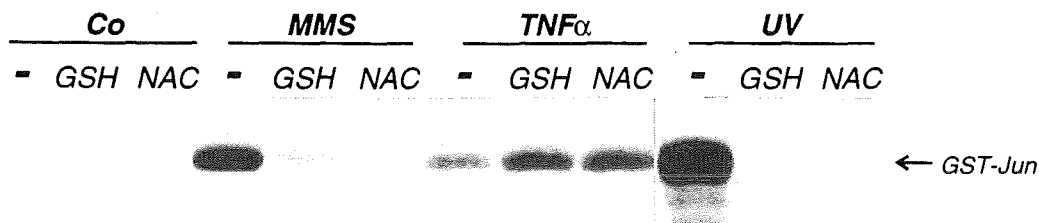


Abb. 29: GSH- und NAC-Vorbehandlung hemmt MMS- und UV-, nicht aber TNF α -induzierte JNK/SAPK-Aktivierung

Humane 293 Zellen wurden entweder nicht (-) oder mit GSH (15 mM) bzw. NAC (15 mM) für 2 h vorbehandelt, und anschließend entweder direkt (Co) oder nach Behandlung mit MMS (1 mM, 2 h), TNF α (5 ng/ml, 15 min) oder UV (40 J/m², 30 min) geerntet. Endogene JNK/SAPKs wurden mit Hilfe polyklonaler Antikörper (JNK1, C-17 und JNK2, N-18, Santa Cruz) immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Immunkomplex mit GST-Jun und [γ -³²P]ATP als Substrat bestimmt. Die gesamte Reaktion wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel nach Beendigung der Elektrophorese gewaschen, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm zehn Minuten lang exponiert.

Die JNK/SAPK-Aktivierung nach UV-Strahlung wurde durch einen erhöhten GSH-Spiegel vollständig gehemmt. Dies stand im Einklang mit früheren Untersuchungen (Devary *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurde die Induktion durch TNF α nicht beeinflusst (Abb. 29). Dies läßt auf unterschiedliche Signalkomponenten bei der Aktivierung von JNK/SAPKs als Antwort auf UV, MMS und TNF α schließen.

Diskussion

Bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung aber auch bei der Transformation und Karzinogenese spielt das Produkt des Proto-Onkogens *c-jun* eine zentrale Rolle. Transfektionsexperimente mit primären oder immortalisierten Zelllinien ergaben, daß die Überexpression von cJun Zelltransformation auslösen kann. Umgekehrt kann das Ras-Onkoprotein in Zellen, die kein cJun exprimieren, nicht die Transformation auslösen (Johnson *et al.*, 1996b). Auch bei der Transformation von Zellen durch das Onkoprotein E1A könnte die dabei beobachtete transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* eine wichtige Rolle spielen. So reicht im "klassischen" Zelltransformations-Test zum Nachweis der Kooperation von Onkogenen die Überexpression von cJun und Ras Protein aus, um den kooperativen Effekt von Ras und E1A zu erhalten. Diese transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* ist aber auch ein Charakteristikum der Antwort von Zellen auf unterschiedliche Arten von Streß. Die bisher stärkste Induktion erreicht man durch die Behandlung von Zellen mit der alkylierenden Substanz MMS. Auch hier scheint die verstärkte cJun-Expression eine essentielle Rolle für die Zelle zu spielen, da der Verlust von cJun (in Zellen von *c-jun*-"knock out"-Mäusen) zu einer Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen führt (pers. Mitteilung, A. Kolbus, DKFZ, Heidelberg). In der vorliegenden Arbeit, habe ich die Signaltransduktionswege untersucht, die von zwei völlig verschiedenen Induktoren (E1A und MMS) aktiviert werden, um damit die verstärkte Expression von cJun zu gewährleisten. Im folgenden wurde dabei zuerst auf die Signalwege eingegangen, die durch das Onkoprotein E1A ausgelöst werden.

Das E1A-Protein des menschlichen Adenovirus ist ein multifunktionales Onkoprotein, das an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist, z.B. transkriptionelle Aktivierung und Repression, Hemmung der Differenzierung, Stimulierung des Zellzyklusses und maligne Transformation (zur Übersicht siehe: Moran, 1993). Diese Aktivitäten sind die Folge komplexer Interaktionen zwischen dem viralen Onkoprotein und verschiedener intrazellulärer Proteine, die in Zellwachstum und Regulation der Transkription involviert sind. Neben der Assoziation mit verschiedenen zellulären Proteinen (pRb, p107, p130, Cyclin E und A und Cdk2; zur Übersicht siehe: Dyson und Harlow, 1992), die eine Schlüsselrolle bei der Zellzyklus-Regulation spielen, wird die Expression zellulärer Gene beeinflusst, die

über den Transkriptionsfaktor AP-1/ATF reguliert werden. So wird der Promotor des *c-jun*-Proto-Onkogens aktiviert, was als Ursache der konstitutiv erhöhten Menge an cJun-Protein in Adenovirus-transformierten Zellen angesehen wird. Da die Überexpression von cJun gemeinsam mit Ras, ebenso wie E1A und Ras, bei der Transformation von Zellen kooperieren, liegt die Vermutung nahe, daß die Aktivierung des *c-jun*-Gens zur Fähigkeit von E1A Zellen zu transformieren beiträgt. Diese Aktivierung beruht auf der Phosphorylierung von an den Promotor gebundenen ATF-2-Homo- und cJun/ATF-2-Heterodimeren. Da E1A selbst keine Kinaseaktivität besitzt, müssen zelluläre Proteinkinasen durch E1A aktiviert oder Phosphatasen gehemmt werden.

Mit Hilfe der stabilen Zelllinie MT-3, bei der die Expression von E1A durch Cadmium-Behandlung der Zellen induziert werden kann, konnte ich erstmals nachweisen, daß E1A sowohl JNK/SAPKs als auch p38-MAP-Kinase aktiviert. Diese Aktivierung beruht jedoch nicht auf einer direkten Interaktion zwischen diesen Proteinkinasen und E1A. Bei der Immunpräzipitation aus Proteinextrakten von E1A-exprimierenden Zellen mit E1A-spezifischen Antikörpern konnte keine Kinaseaktivität koimmunpräzipitiert werden, die cJun oder ATF-2 *in vitro* phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Stattdessen konnte ich nachweisen, daß der für JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase gemeinsame Aktivator, SEK1/MKK4, ebenfalls durch die Expression von E1A aktiviert wird. Ob SEK1/MKK4 durch direkte oder indirekte Interaktion stimuliert wird, oder ob eine spezifische Phosphatase inhibiert wird, ist noch nicht bekannt.

Viele Funktionen von E1A werden über eine direkte Bindung an eine Gruppe von zellulären Genen vermittelt, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Zu diesen Proteinen zählen pRb, p107, CyclinA und p33-Cdk2; Proteine die selbst Kinasen sind oder mit Kinasen interagieren (Hunter, 1991; Nevins, 1992). Man vermutet, daß die Wirkungen von E1A auf diese Proteine die relative Menge und Aktivität verschiedener Kinasekomplexe in der Zelle beeinflusst. So wurde eine direkte Interaktion von E1A mit einer zellulären CTD Kinase beschrieben (Hermann *et al.*, 1996). Diese Proteinkinase phosphoryliert den C-Terminus der RNA-Polymerase II und reguliert damit die Initiation, Aktivierung und Elongation der Transkription (Cadena und Dahmus, 1987; Spencer und Groudine, 1990; Marshall und Price, 1992; Kang und Dahmus, 1993; O'Brian *et al.*, 1994). Es handelt sich dabei jedoch nicht um die schon bekannte MO15/TFIIH-Kinase (Hermann *et al.*, 1996).

Neben der Steigerung der Aktivität nimmt E1A auch einen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivierung zellulärer Kinasen. So wurde für p70^{s6k} gezeigt, daß E1A sowohl die mRNA- und Proteinmenge erhöht als auch ihre Aktivität steigert (de Groot *et al.*, 1995). p70^{s6k} phosphoryliert das S6-Protein der ribosomalen 40S-Untereinheit. Diese Phosphorylierung scheint für die Translation einer Vielzahl von mRNAs wichtig zu sein (Morley und Thomas, 1991). Die Induktion von p70^{s6k} durch E1A korreliert mit der Anwesenheit der CR1-Region und der morphologischen Transformation durch E1A (de Groot *et al.*, 1991). Für die induzierte Phosphorylierung von cJun und ATF-2 durch E1A ist ebenfalls CR1 notwendig (van Dam *et al.*, 1990; Kitabayashi *et al.*, 1991). Diese Region ist zusammen mit dem N-Terminus für die Assoziation mit dem nukleären Phosphoprotein p300 verantwortlich (Egan *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1990). Die Expression von E1A induziert ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung dieses Proteins (Kitabayashi *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung wird zum Teil vermittelt durch Cdk2, die im CyclinA-Komplex assoziiert vorliegt, zum Teil jedoch auch durch Interaktion mit anderen, bis jetzt noch unbekanntem, zellulären Kinasen (Barbeau *et al.*, 1994). Welche Rolle die Phosphorylierung von p300 spielt, und ob die dafür verantwortlichen Kinasen in Zusammenhang mit der beobachteten JNK/SAPK-Aktivierung stehen, muß noch untersucht werden.

Obwohl die Zahl der Berichte über die direkte Beeinflussung zellulärer Kinasen durch E1A überwiegt, ist die Möglichkeit der Hemmung einer Phosphatase nicht auszuschließen. Durfee *et al.* (1993) konnten nachweisen, daß pRb, das mit E1A assoziierte Tumorsuppressor-Protein, mit der katalytischen Untereinheit einer neu charakterisierten Proteinphosphatase des Typ I (PP-1 α 2) interagiert. Die Klasse der Typ I-Phosphatasen sind die dominierenden Serin/Threonin-Phosphatasen im Zellkern und gehören zu den am höchsten konservierten, bekannten Enzymen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Prozessen, wie Regulation des Zellzyklusses, Kontrolle der Proteinsynthese oder Regulation des Glykogenmetabolismus (zur Übersicht siehe: Cohen, 1989; Cyert und Thorner, 1989). Ihre Aktivität und subzelluläre Lokalisation wird durch Assoziation mit anderen zellulären Faktoren reguliert (Cohen, 1989; Beullens *et al.*, 1992). E1A könnte damit, über die Interaktion mit Rb, diese Regulation von PP-1 beeinflussen. Inwieweit dies eine Rolle bei der Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges eine Rolle spielt ist unklar. An der Bindung von pRb durch E1A ist sowohl CR1 als auch CR2 beteiligt (Egan *et al.*,

1988; Whyte *et al.*, 1989), für die Aktivierung von *c-jun* ist CR2 jedoch entbehrlich (van Dam *et al.*, 1990; Kitabayashi *et al.*, 1991).

Die Steigerung der Phosphorylierung der an den Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren muß nicht der einzige Mechanismus sein über den E1A die Transkription des *c-jun*-Proto-Onkogens aktiviert. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt mit denen E1A die Transkription zellulärer Gene beeinflussen kann. So erfolgt die Aktivierung zahlreicher Gene nur durch die Expression der 13S-Form des E1A. Dabei agiert E1A als Koaktivator indem es über CR3 mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert (Liu und Green, 1994; Scholer *et al.*, 1991). Für die Induktion des *hsp70*-Promotor sind, ähnlich wie bei der des *c-jun*-Promotors, N-terminale Sequenzen und ein Teil von CR1 (Aminosäure 2 bis 51) verantwortlich (Kraus *et al.*, 1992). Man nimmt an, daß diese Aktivierung durch die Verdrängung des Transkriptionsinhibitor Dr1 von TBP ("TATA-binding protein") verursacht wird (Inostroza *et al.*, 1992). Ein ebenfalls von E1A beeinflusster Faktor ist YY1. YY1 kann auf der einen Seite als Transkriptionsinitiator wirken, indem er RNA-Polymerase II zum Promotor dirigiert. Auf der anderen Seite hemmen "stromaufwärts" gelegen YY1-Bindestellen die Transkription. Diese Hemmung kann durch direkte Bindung von E1A an YY1 aufgehoben werden (Shi *et al.*, 1991; Usheva *et al.*, 1994).

Zur Aktivierung des *c-jun* Promotors könnte ebenfalls die Induktion der Expression von ATF-3 beitragen. ATF-3 ist ein Mitglied der AP-1/ATF-Transkriptionsfaktorfamilie und kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit cJun, JunB und JunD bilden. Diese Dimere können durch Bindung an ATF/CREB oder AP-1 Konsensussequenzen Transkription aktivieren. Eine Ausnahme bilden JunB/ATF-3-Komplexe, die unter bestimmten Bedingungen hemmend wirken (Chu *et al.*, 1994; Hai und Curran, 1991; Hsu *et al.*, 1991, 1992, 1993). Hagemeyer *et al.* (1996) wiesen nach, daß in Adenovirus-transformierten Zellen die Expression von ATF-3 konstitutiv induziert ist. Bindung von cJun/ATF-3-Heterodimere an die AP-1-ähnlichen Bindestellen im *c-jun*-Promotor könnte bedeutend sein bei der Aktivierung durch E1A. Es ist bekannt, daß die Zusammensetzung der Dimere eine entscheidende Rolle bei der Wirkung von E1A auf die Transkription spielt. So werden, im Gegensatz zu ATF-2-Homo- und cJun/ATF-2-Heterodimere, cJun-Homo- und cJun/cFos-Heterodimere durch E1A reprimiert. Diese Repression beruht auf einer Hemmung der DNA-Bindung dieser Komplexe, die jedoch nicht durch erhöhte Phosphorylierung innerhalb der DNA-Bindedomäne vermittelt wird (Hagemeyer *et al.*,

1993). Diese unterschiedlichen Wirkungen könnten auf der Interaktion der verschiedenen Dimere mit spezifischen Faktoren beruhen, auf die E1A einen unterschiedlich Einfluß ausübt. So ist eine Stabilisierung bzw. Destabilisierung bestimmter Dimere oder z.B. eine Erhöhung oder Erniedrigung der DNA-Bindungs-Affinität durch zusätzliche, zelluläre Faktoren denkbar. Zwei Proteine, die AP-1 hemmen wurden bis jetzt beschrieben: IP-1 (Auwerx und Sassone-Corsi, 1991, 1992) und Jif-1, ein Protein das cJun binden kann und dadurch die Bindung an die DNA verhindert (Montecarlo und Vogt, 1993). Die Dimerisierung von cJun mit ATF-2 oder ATF-3 könnte die Bindung eines solchen Proteins hemmen, und diese Komplexe damit insensitive gegenüber der Hemmung durch E1A machen.

Mit Hilfe des Östrogen-induzierbaren Zellklons konnte ich nachweisen, daß die Expression von E1A allein nicht ausreicht um JNK/SAPKs effizient zu aktivieren. Erst bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Schwermetall Cadmium, in einer Konzentration, die ebenfalls zur Induktion alleine nicht ausreicht, war eine sehr starke Aktivierung meßbar. Dies könnte darauf beruhen, daß in diesem Zellklon keine ausreichenden Mengen an aktivem E1A-ER-Fusionsprotein vorhanden war. Das Gen dieses exogenen Fusionsproteins wurde unter die Kontrolle des E1A-Promotor kloniert. Während der Etablierung der stabilen Zellklone wurde bekannt, daß dieser Promotor nur in proliferierenden Zellen aktiv ist (Dieckmann und Krippel, 1994). Um den Basalwert der Aktivität des exogenen E1A-ER-Fusionsprotein niedrig zu halten wurde zu den Zellen vor der Induktion mit Östrogen Medium ohne Phenolrot gegeben. Da jedoch das Wachstum der Zellen in diesem Medium deutlich verlangsamt war, ist nicht sicher, ob tatsächlich genügend Protein exprimiert wurde, um JNK/SAPKs effizient zu aktivieren.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß E1A spezifisch p38-MAP-Kinase über die Aktivierung von MKK3 oder MKK6 induziert, und die Aktivierung von SEK1/MKK4 nur ein Nebenweg darstellt. Die geringe Cadmium-Konzentration könnte die Synthese einer "stromaufwärts" der JNK/SAPKs gelegenen Kinase suboptimal stimulieren, was die sehr späte Aktivierung nach acht Stunden erklären würde. Kommen beide Signale zusammen bewirken sie eine effiziente JNK/SAPK-Aktivierung, die, aufgrund des geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Stimulation durch Cadmium, ebenfalls erst nach acht Stunden erkennbar wird. Da eines der Substrate der p38-MAP-Kinase ATF-2 darstellt, würde dies auch die spezifische Aktivierung von cJun/ATF-2-Dimere erklären. Die in Adenovirus-

transformierten Zellen beobachtete cJun Phosphorylierung könnte auf einem kumulativen Effekt der suboptimal aktivierten JNK/SAPKs beruhen. Cadmium könnte auch indirekt einen Einfluß auf das E1A-Protein selbst haben, so daß nach Behandlung der Zellen mit Cadmium E1A in einen aktivierten Zustand versetzt wird, der es ihm erlaubt JNK/SAPKs effektiv zu induzieren.

Die durch die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges verstärkte Phosphorylierung von cJun (und ATF-2) ist direkt in den Transaktivierungsprozeß involviert und ist für die Kooperation von cJun mit Ha-Ras bei der Transformation notwendig (Smeal *et al.*, 1991). Mutationen der Phosphorylierungsstellen Serin 63 und Serin 73 zerstören die induzierbare Transaktivierungsfunktion von cJun (Smeal *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 1992; Devary *et al.*, 1992; Radler-Pohl *et al.*, 1993). Je nach Aminosäure die die mutierten Serine ersetzt, unterscheiden sich die cJun-Mutanten in ihrer basalen Aktivität (Pulverer *et al.*, 1991; Smeal *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 1992; Radler-Pohl *et al.*, 1993). Dies macht deutlich, daß zusätzlich zur erhöhten negativen Ladung, verursacht durch die Phosphorylierung, auch die dreidimensionale Struktur des N-Terminus für die verstärkte Transaktivierung wichtig ist. Man stellt sich vor, daß bei Transkriptionsfaktoren, die nicht selbst mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren, Koaktivatoren notwendig sind, die als Brückenproteine zwischen beiden fungieren. Ein solcher intermediärer Faktor, p52/54, der spezifisch mit der Transaktivierungsdomäne von cJun interagiert, wurde schon beschrieben (Oehler und Angel, 1992). Dabei ist zu erwarten, daß die Phosphorylierung der Serine an den Positionen 63 und 73 für die Bindung des Kofaktors notwendig ist. Ein Beispiel für einen phosphorylierungsabhängigen Koaktivator ist das nukleäre Protein CBP ("CREB-binding protein") (Chrivia *et al.*, 1993). CBP bindet nur die Form des Transkriptionsfaktors CREB, die durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wurde. CBP kann ebenfalls cJun binden. Diese Interaktion ist jedoch unabhängig vom Phosphorylierungszustand von cJun (Bannister *et al.*, 1995). Ein Mechanismus, wie CBP trotzdem, phosphorylierungsabhängig, als Koaktivator für cJun fungieren könnte, ist vorstellbar: An die nicht-phosphorylierte Transaktivierungsdomäne von cJun könnte ein inhibitorisches Protein gebunden sein, das erst nach Phosphorylierung abdissoziiert. Ein solches inhibitorisches Protein könnte ein Mitglied der JNK/SAPKs darstellen, das an cJun im nicht-aktivierten Zustand bindet (Dai *et al.*, 1995). Durch dessen Aktivierung ist es in der Lage cJun zu phosphorylieren. Dies hätte die Freisetzung der Kinase und damit die Zugänglichkeit für

den Koaktivator zur Folge. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, daß diese Kinasen an die δ -Domäne des cJun binden. Für diese Domäne wurde nachgewiesen, daß sie mit einem Faktor interagiert und dadurch cJun Funktionen gehemmt werden (Baichwal und Tjian, 1990).

Die durch E1A und der alkylierenden Substanz MMS induzierten Signaltransduktionswege werden nach einer Vielzahl von Stimuli aktiviert, die zellulären Streß ausüben, z.B. UV-Strahlung, $\text{TNF}\alpha$, osmotischer Streß oder Hitzeschock. Im Gegensatz jedoch zur UV-Strahlung, die eine Aktivierung aller drei bis jetzt in Säugetierzellen bekannten Klassen der MAP-Kinase-Familie bewirkt, konnte ich nachweisen, daß E1A und MMS nur JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase induzieren. Die Behandlung mit dem Phorbolster TPA ausschließlich die MAP-Kinase-Unterfamilie ERK1 und ERK2 aktiviert (Daten nicht gezeigt). Diese parallelen Proteinkinase-Kaskaden können demnach, je nach Induktor, unabhängig voneinander oder simultan aktiviert werden, um so eine bestimmte physiologische Antwort der Zellen auf unterschiedliche Stimuli zu adaptieren.

Mit der Aktivierung der JNK/SAPKs bzw. p38-MAP-Kinase und die in der Signaltransduktion "stromaufwärts" gelegenen Kinasen nutzten E1A und MMS einen allgemeinen Mechanismus der Zelle aus, um Einfluß auf die fein abgestimmte Regulation der Transkription von Genen zu nehmen, die in Zellwachstum und Differenzierung involviert sind. Ein guter Vergleich dazu liefert die Differenzierung von F9-Zellen, einer embryonalen Maus-Teratokarzinom-Zelllinie (Bernstine *et al.*, 1973). Diese Zellen können durch Behandlung mit Retinsäure induziert werden. Dadurch differenzieren sie zu Zellen, die denen des primitiven, extra-embryonalen Endoderm des Mausembryos entsprechen (Strickland und Mahdavi, 1978). Als Folge der Retinsäure-vermittelten Differenzierung kommt es zu drastischen Veränderungen in der Genexpression, unter anderem zu einem starken Anstieg der *c-jun* Transkription (de Groot *et al.*, 1990; Yang-Yen *et al.*, 1990; Kitabayashi, 1992). Diese Induktion beruht ebenfalls, wie ich in einem In-Gel-Kinase-Assay nachweisen konnte, auf der Aktivierung der JNK/SAPKs (Daten nicht gezeigt).

Es wird aber auch vermutet, daß die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges eine Rolle bei der Induktion von Apoptose, den programmierten Zelltod, eine Rolle spielt (Cuvillier *et al.*, 1996; Gulbins *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996a; Latinis und Koretzky, 1996; Verheij *et al.*, 1996). So konnte z.B. die durch unterschiedlichen Stress (UV-Strahlung, H_2O_2 , Hitzeschock) und $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung ausgelöste Apoptose durch Überexpression eines

transdominant negativ wirkenden SEK1- oder cJun-Proteins gehemmt werden (Verheij *et al.*, 1996). Bei Verwendung anderer Zellen wurde jedoch nachgewiesen, daß die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges alleine nicht ausreicht, um Apoptose zu induzieren (Gardner und Johnson, 1996). Sowohl für E1A als auch für MMS wurde beschrieben, daß sie in Zellen Apoptose auslösen können (White *et al.*, 1991; White, 1993; Rao *et al.*, 1992; Debbas und White, 1993; Fairbairn *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 1996). Ebenso wie nach TNF α -Behandlung ist in beiden Fällen (E1A-Expression und MMS-Behandlung) die Induktion der Apoptose durch Expression von E1B oder Bcl-2, einem anti-apoptotischen Proteins, hemmbar (Rao *et al.*, 1992). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob die Stimulation von JNK/SAPKs und damit die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun*-Gens direkt in den Apoptose-Weg involviert sind. Es sieht eher so aus, als ob dies abhängig von der verwendeten Zelltyp und des Induktors ist. Im Falle des E1A-Proteins spricht die Tatsache dafür, daß die gleichen Domänen, die für die transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* notwendig sind, auch ausschlaggebend bei der Induktion der Apoptose sind (White und Stillman, 1987; van Dam *et al.*, 1990; Kitabayashi *et al.*, 1991; White *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu konnte ich bei der Behandlung von Zellen mit MMS nachweisen, daß die JNK/SAPK-Aktivierung nicht mit ihrer zytotoxischen Wirkung korreliert. Auch bei einer Konzentration von 10 μ M, die keine negativen Auswirkungen auf das Überleben der Zellen hat (persönliche Mitteilung, A. Kolbus, DKFZ, Heidelberg), ist noch eine Aktivierung der JNK/SAPKs detektierbar. Außerdem hat 3-Aminobenzamid, ein Hemmstoff der Poly-(ADP-ribose) Polymerase, der ein Absterben von Zellen nach MMS-Behandlung verhindern kann (Mizumoto *et al.*, 1993), keinen Einfluß auf die Induktion der JNK/SAPKs durch MMS.

Alkylierende Substanzen gelten als die bisher stärksten Induktoren der *c-jun*-Transkription. Monofunktionale, alkylierende Agenzien, wie z.B. MMS oder MNNG, kommen zwar nicht natürlicherweise in der Umwelt vor, werden aber oft als Modellverbindungen verwendet, um die Mechanismen zu untersuchen, mit denen genotoxische Chemikalien mit der DNA und anderen zellulären Komponenten reagieren und sie schädigen. Diese Alkylanzien greifen in die Regulation der Expression bestimmter Gene ein. Dieses spezifische Gen-Expressionsmuster, das auch als zelluläre Streß-Antwort bezeichnet wird, beinhaltet die Aktivierung von JNK/SAPKs.

Ebenso wie nach der Expression von E1A beruht die JNK/SAPK-Induktion durch MMS auf der Aktivierung der "stromaufwärts" gelegenen Proteinkinase SEK1 (= MKK4). Da SEK1/MKK4 ebenfalls als Aktivator von p38-MAP-Kinase beschrieben worden ist (Dérillard *et al.*, 1995), und p38-MAP-Kinase mit der gleichen Kinetik wie JNK/SAPKs nach MMS-Behandlung aktiviert wird, ist anzunehmen, daß diese Aktivierung über den gleichen Signaltransduktionsweg erfolgt. Ob ebenfalls MKK3 oder MKK6, die spezifisch nur p38-MAP-Kinase phosphorylieren (Dérillard *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1996), aktiviert werden, ist nicht bekannt.

SEK1/MKK4 wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Als möglicher Kandidat wurde MEKK1 beschrieben (Minden *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994). MEKK1 wurde ursprünglich als eine Kinase identifiziert, die MEK *in vitro* phosphorylieren kann, und damit ERK1 und ERK2 aktiviert (Lange-Carter *et al.*, 1993; Lange-Carter und Johnson, 1994). Durch Koexpression einer transdominant-negativen Mutante von MEKK1 (Δ MEKK1, Minden *et al.*, 1994) konnte ich die Aktivierung von SEK1/MKK4 durch MMS hemmen. Δ MEKK1 ist in ihrem aktiven Zentrum mutiert. Dies hat zur Folge, daß diese Kinase zwar noch Signale von "oben" empfangen, sie aber nicht mehr nach "unten" weiterleiten kann. Durch die Überexpression einer solchen Mutante werden Signaltransduktionswege, in die die endogene, nicht-mutierte Form dieser Kinase involviert ist, blockiert. Dies bedeutet, daß sehr wahrscheinlich MEKK1 selbst in die MMS-Antwort involviert ist. Denkbar wäre auch, daß diese transdominant-negative Mutante andere, eng verwandte Proteinkinasen hemmt. Dagegen spricht jedoch meine Beobachtung, daß die Transaktivierung von JNK/SAPKs durch eine konstitutiv aktive MEKK1 durch MMS-Behandlung nicht zusätzlich gesteigert werden kann (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges stellt keine allgemeingültige Antwort der Zellen auf Behandlung mit alkylierenden Agenzien dar. Sie wird induziert durch Substanzen wie MMS und MNNG, nicht jedoch durch ENU. Die Unterschiede dieser Alkylanzien bestehen in ihrer elektrophilen Stärke und den dadurch unterschiedlichen chemischen Reaktionsmechanismen mit denen sie Zielmoleküle alkylieren. Als Folge davon verursachen sie verschiedene Alkylierungsprodukte. Fast alle diesbezüglichen Untersuchungen beschränken sich auf die Reaktionen und Alkylierungsprodukte der DNA. MMS und MNNG reagieren beide vor allem mit dem Ringstickstoff der Purinbasen (Beranek *et al.*, 1980). Dieser Defekt korreliert mit der Induktion von Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und Zelltod (Natarajan *et al.*, 1984). Nur etwa

0,3% ihrer gesamten Alkylierungsprodukte der DNA sind O⁶-Methylguanine, der Läsion die hauptverantwortlich ist für Mutagenese und Karzinogenese. Im Gegensatz dazu sind bis zu 9% der DNA-Schäden verursacht durch ENU O⁶-Ethylguanine. ENU ist damit die monofunktionale alkylierende Substanz mit der höchsten Mutagenität und Karzinogenität. Diese Unterschiede in den, von den verschiedenen Alkylanzien verursachten Alkylierungsschäden der DNA spiegeln sich auch in ihrer Fähigkeit JNK/SAPKs zu aktivieren wider. MMS und MNNG stimulieren diese Proteinkinasen sehr effizient. Im Unterschied dazu ist nach ENU-Behandlung keine Steigerung ihrer Enzymaktivität meßbar. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung des DNA-Schadens bei der Signalinitiation hin. Dagegen spricht jedoch zum einen die Tatsache, daß die Tyrosinkinase cAbl keine Rolle bei der beobachteten MMS-Antwort spielt (Daten nicht gezeigt). Von cAbl wird vermutet, daß sie in die Signaltransduktion, die durch DNA-schädigende Substanzen (Bsp. Mitomycin C, γ -Strahlung) initiiert wird, zur Stimulation des JNK/SAPK-Weges involviert ist (Kharbanda *et al.*, 1995). Zum anderen konnte ich aber auch nachweisen, daß in Zellen ohne Kern (Zytoplasten) JNK/SAPKs mit dem gleichen Aktivierungsfaktor durch MMS induziert werden wie in intakten Zellen. Bei diesem experimentellen Ansatz läßt sich ein Einfluß von Schäden der mitochondrialen DNA nicht ausschließen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, daß zelluläre Proteine als initiale Angriffspunkte fungieren. Die unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der verschiedenen alkylierenden Substanzen haben ebenfalls einen Einfluß auf die Alkylierung von zellulären Proteinen. MMS und MNU ("*methylnitrosourea*", überträgt eine Methylgruppe anstelle einer Ethylgruppe, ist ansonsten jedoch mit ENU vergleichbar) weisen qualitative und quantitative Unterschiede bei der Alkylierung von Proteinen *in vitro* auf (Paik *et al.*, 1984).

Für UV-Strahlung wurde beschrieben, daß Wachstumsfaktor-Rezeptoren in der Zellmembran initiale Angriffspunkte sind, die zur Aktivierung des ERK1/2-Signalweges führen (Sachsenmeier *et al.*, 1994). Möglich war dies durch die Verwendung von Suramin, einem generellen Inhibitor für Rezeptoren die in der Membran verankert vorliegen (Betzholtz *et al.*, 1986; Huang und Huang, 1988; Yayon und Klagsbrun, 1990). Diesen Befund konnte ich auch auf die Aktivierung von JNK/SAPKs nach UV-Bestrahlung ausweiten. Sie läßt sich ebenfalls durch die Vorbehandlung mit Suramin deutlich hemmen. Im Gegensatz dazu hat Suramin auf die Stimulierung von JNK/SAPKs durch MMS-Behandlung keine Auswirkung. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Beobachtung, daß MMS, im Unterschied zu UV-Strahlung, keine Hyperphosphorylierung des EGF-

Rezeptors induziert (Daten nicht gezeigt, in Zusammenarbeit mit A. Knebel, IGEN, Karlsruhe).

Die genauere Untersuchung einer weiteren Klasse von Zelloberflächen-Rezeptoren, den G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, war möglich durch die Verwendung eines Zellsystems, das stabil β ARK (β -adrenerger-Rezeptor-Kinase) exprimiert. Zur Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors verwendete ich LPA ("*lysophosphatidic acid*"). Dabei handelt es sich um einen interzellulären Phospholipid-"messenger" mit einer Vielzahl biologischer Funktionen (zur Übersicht siehe: Moolenaar, 1995a, b). Ich konnte erstmals zeigen, daß LPA in der Lage ist JNK/SAPKs zu induzieren. Diese Induktion wird durch die Überexpression des β ARK-Proteins gehemmt. Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung des Liganden hat zur Folge, daß die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins abdissoziieren und als "second messenger" Signalwege induzieren. Das β ARK-Protein bindet freigesetzte $\beta\gamma$ -Untereinheiten und blockiert somit die Signalweiterleitung in den Zellkern (Crespo *et al.*, 1995). Dies bedeutet, daß in der Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges durch LPA $\beta\gamma$ -Untereinheiten involviert sind. Im Unterschied dazu ist keine Hemmung bei der JNK/SAPK-Aktivierung durch MMS, $\text{TNF}\alpha$ oder UV-Strahlung.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß MMS weder über die Stimulierung von Wachstumsfaktor- noch von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf die Aktivität des JNK/SAPK Signalweges wirkt.

Damit konnte ich bei der MMS-Antwort eine Beteiligung verschiedener Signalweg-Komponenten ausschließen, die von anderen, Streß-auslösenden Induktoren, aktiviert werden. Offen bleibt jedoch immer noch die Frage nach dem primären Zielmolekül(en), das (die) für die spezifische MMS-Signaltransduktion verantwortlich ist. Denkbar wäre, daß MMS direkt eine der im JNK/SAPK-Weg "stromaufwärts" gelegenen Komponenten, z.B. MEKK1, Cdc42 und/oder Rac1 (Minden *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994; Coso *et al.*, 1995a, b; Minden *et al.*, 1995; Voijtek und Cooper, 1995) methyliert. Diese Methylierung und die dadurch bedingte Konformationsänderung könnten eine Steigerung der Aktivität zur Folge haben. Auf der anderen Seite besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß aufgrund der Methylierung spezifische Phosphatasen gehemmt werden und so indirekt die Phosphorylierung eines kritischen Moleküls erhöht wird.

Detaillierte Untersuchungen von Tyrosinphosphatasen ergaben, daß die Sequenz Cys-X₅-Arg im katalytischen Zentrum essentiell für die Phosphoester-Hydrolyse ist. Dieses Motiv findet man ebenfalls in Serin/Threonin- und sauren Phosphatasen (Zhang *et al.*, 1994).

Direkte Modifikation des Cystein-Restes durch z.B. S-Glutathionisierung nach oxidativem Streß hemmt die katalytische Funktion (Stuckey *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Auch Modifikationen des Arginin-Restes führen zur Inaktivierung der Phosphatase (Zhang *et al.*, 1994). So weiß man, daß diese Aminosäure z.B. empfindlich gegenüber Metall-katalysierter Oxidation ist (Climent und Levine, 1991).

Eine Hemmung von Tyrosinphosphatasen wurde erst kürzlich bei der Aktivierung des EGF- und des PDGF-Rezeptors nach UV-Strahlung beschrieben (Knebel *et al.*, 1996). Diese Hemmung der Tyrosin-Phosphatasen beruht auf einer direkten Modifizierung von SH-Gruppen im aktiven Zentrum und kann in der Anwesenheit von reduzierenden Agenzien, wie NAC (*N*-Acetylcystein) gehemmt werden (Knebel *et al.*, 1996). Dieses Ergebnis unterstützt frühere Beobachtungen, daß bei der Aktivierung von JNK/SAPKs und der Induktion der *c-jun* Transkription durch UV-Strahlung oxidativer Streß eine Rolle spielt (Devary *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1995).

Eine direkte Modifikation von SH-Gruppen durch die alkylierende Substanz MMS konnte ich nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Diese Nachweismethode beruht auf der Hemmung der SH-abhängigen Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase, unterstützt durch die Messung freier SH-Gruppen mittels 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzolsäure, so daß eine Reaktion von MMS mit SH-Gruppen spezifischer Phosphatasen nicht ausgeschlossen werden kann. In *in vitro* Reaktionen mit Cytochrom C alkyliert MMS vor allem Lysin- und Histidin-Reste (Paik *et al.*, 1984). So ist denkbar, daß MMS nicht durch direkte Inaktivierung des katalytischen Zentrums eine spezifische Phosphatase hemmt, sondern durch Konformationsänderung bedingt durch Alkylierung einer oder mehrerer Aminosäuren, die sich nicht im katalytischen Zentrum befinden. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, daß MMS, im Vergleich zu UV-Strahlung, zelluläre Signalwege spezifischer aktiviert. Da man in den meisten Phosphatasen das gleiche Motiv mit der essentiellen SH-Gruppe im aktiven Zentrum findet, müßte eine direkte Modifikation zur Inaktivierung verschiedenster Phosphatasen führen. Dies hätte zur Folge, daß eine ganze Reihe von Signalwegen induziert werden, wie das nach UV-Bestrahlung von Zellen zu beobachten ist (Pulverer *et al.*, 1991; Hibi *et al.* 1993; Kyriakis *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994). Nach MMS-Behandlung kann man nur die Aktivierung eines Signalweges, der zur Stimulation von JNK/SAPKs und p38-MAP-Kinase führt, messen. Im Gegensatz dazu stimuliert UV-Strahlung alle drei bis jetzt in Säugetierzellen bekannten MAP-Kinase-Signaltransduktionswege.

Erst kürzlich wurde beschrieben, daß die Aktivierung von JNK/SAPKs nach Arsenit-Behandlung auf der Hemmung einer spezifischen JNK/SAPK-Phosphatase beruht. Bei dieser Phosphatase scheint es sich um ein zytosolisches, konstitutiv aktives Enzym zu handeln, das sowohl JNK/SAPKs als auch p38-MAP-Kinase dephosphoryliert (Cavigelli *et al.*, 1996). Da ich jedoch nachweisen konnte, daß auch die "stromaufwärts" gelegene Proteinkinase SEK1/MKK4 und vermutlich auch MEKK1 durch MMS stimuliert werden, dürfte die durch Arsenit gehemmte Phosphatase keine Rolle bei der MMS-Antwort spielen. Aus dem gleichen Grund ist es unwahrscheinlich, daß die für JNK/SAPKs und ERK1/2 beschriebene MKP-1 und verwandte Phosphatasen (Sun *et al.*, 1993; Muda *et al.*, 1996) durch MMS gehemmt werden. Sie scheinen eher für die negative Rückregulation der JNK/SAPK-Aktivität verantwortlich zu sein, da ihre Expression durch mitogene Stimulation und verschiedenen zellulären Streß, wie z.B. UV-Strahlung und MMS induziert wird (Charles *et al.*, 1992; Keyse *et al.*, 1992; Noguchi *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995).

Ein weiterer Hinweis, daß MMS über die Hemmung einer Phosphatase den JNK/SAPK-Signalweg stimuliert, ist die verzögerte Kinetik der Aktivierung. Die Aktivierung dieser Proteinkinasen nach MMS-Behandlung ist erst nach einer Stunde erkennbar, und erreicht etwa nach zwei Stunden ein Maximum. Dies steht im deutlichen Unterschied zu anderen Induktoren (Maximum nach UV-Strahlung: 30 min, EGF: 10 min, TNF α : 15 min, Anisomycin: 10 min, Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, daß durch die Inhibition einer Phosphatase das Signal erst langsam akkumuliert, bis eine effiziente Aktivierung detektierbar wird. So ist auch nach Arsenit-Behandlung erst nach einer Stunde eine JNK/SAPK-Stimulation erkennbar (Cavigelli *et al.*, 1996).

Diese sehr späte Aktivierung könnte aber auch daraufhin deuten, daß hierzu Protein-Neusynthese notwendig ist. In Zellen ohne Kern (Zytoplasten) sind JNK/SAPKs jedoch ebenfalls durch MMS induzierbar. Zytoplasten sind zwar in der Lage noch etwa 12-18 Stunden lang Proteine zu synthetisieren (Burke, 1981), doch kann man eine transkriptionelle Aktivierung eindeutig ausschließen. Zudem wurden die Zytoplasten vor der Behandlung für 16 Stunden zur Regeneration inkubiert. So ist ebenfalls ein Einfluß von MMS auf die Translation oder die Stabilität von spezifischen mRNAs äußerst unwahrscheinlich.

Unabhängig von der Frage nach dem initialen Ereignis, konnte ich nachweisen, daß zelluläre Komponenten einen Einfluß auf die Stärke der JNK/SAPK-Aktivität haben, die durch MMS induziert wird. Es stellt sich heraus, daß der Glutathiongehalt der Zellen, und

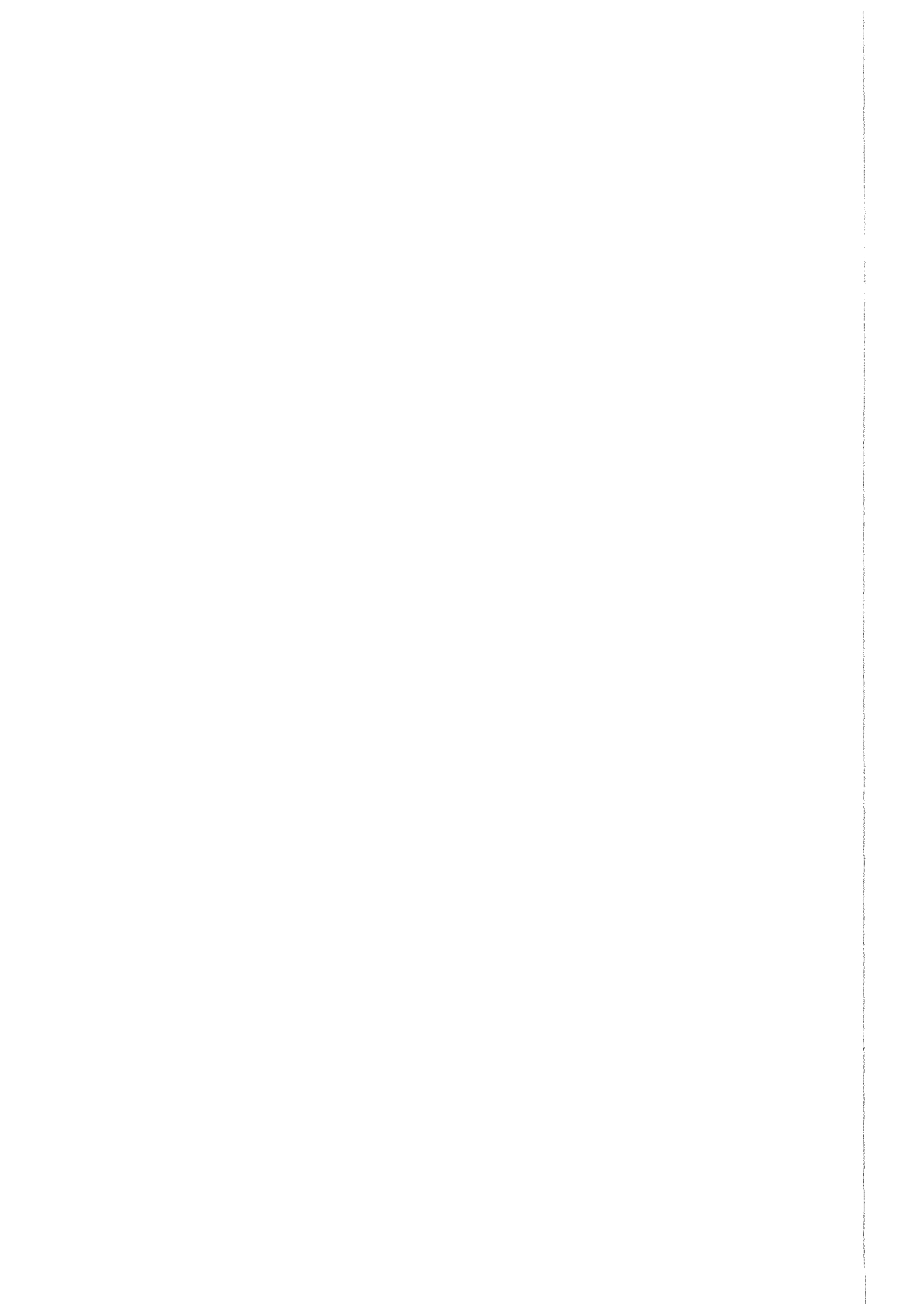
damit ihr Redoxzustand ein entscheidenden Faktor darstellt. Die Aktivierung von JNK/SAPKs durch MMS kann durch Vorbehandlung der Zellen mit Glutathion (GSH) oder N-Acetylcystein (NAC) gehemmt werden. NAC, als ein Vorläufer der GSH-Synthese, erhöht die intrazelluläre Konzentration von Cystein und nachfolgend auch von GSH (Aruoma *et al.*, 1989).

Glutathion und andere Thiole spielen eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation karzinogener Xenobiotika (Chasseaud, 1979). Glutathion reagiert direkt mit Alkylmethansulfonaten, wobei diese Reaktion vermutlich aufgrund Glutathion-S-Transferase (GST)-vermittelter Katalyse erfolgt (Kroese *et al.*, 1990). Dementsprechend bewirkt die Behandlung sowohl mit MMS als auch mit MNNG eine schnelle Verringerung des GSH-Gehaltes (Mizumoto *et al.*, 1993). Diese Manipulation des zellulären GSH-Gehaltes könnte der Auslöser für die Induktion von oxidativen Stresses sein, der, über ein bisher unbekanntes Sensor, die Aktivierung der JNK/SAPK auslöst. Dem entgegen spricht jedoch die Tatsache, daß eine GSH-Depletion keine Stimulation der JNK/SAPK-Aktivität zur Folge hat. Es sieht eher so aus, als ob GSH und NAC, aufgrund der direkten oder Enzymkatalysierten Interaktion mit elektrophilen Verbindungen, einen dominanten, kompetitiven Mechanismus darstellt, der die Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit kritischen Molekülen in der Zelle herabsetzt. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für die frühere Induktion von JNK/SAPKs nach MNNG (eine Stunde) im Vergleich zu MMS (zwei Stunden) geben. MNNG alkylt nicht, im Gegensatz zu MMS, direkt zelluläre Komponenten, sondern muß zuerst in den Zellen in hoch-reaktive Intermediate umgewandelt werden. Dieser Prozeß wird durch nukleophile Substanzen, wie intrazelluläre Thiole unterstützt (McKay, 1949; McCallan, 1968; Osterman-Golkar, 1974). Aufgrund dieser initialen Reaktion könnte der GSH-Gehalt der Zellen schon zu einem gewissen Grad erniedrigt worden sein, so daß eine Reaktion mit kritischen Zellkomponenten schneller stattfinden kann.

Durch die Aktivierung des JNK/SAPKs- und p38-MAP-Kinase-Signalweges kommt es zur Hyperphosphorylierung von cJun, ATF-2 und TCF/Elk (Cano *et al.*, 1994; Cavigelli *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1995; Zinck *et al.*, 1995). Die dadurch bedingte verstärkte *c-jun* und *c-fos* Transkription führt zu einer Erhöhung der AP-1-Aktivität. AP-1 kann an regulatorische Elemente in Promotoren verschiedener Gene binden, die für Xenobiotika-metabolisierende Enzyme kodieren: Glutathion-S-Transferase, Glucuronyltransferasen, NAD(H)-Q-Reduktase (Bergelson *et al.* 1994). Die transkriptionelle Aktivierung dieser Enzyme führt indirekt auch zu einer

Zunahme des zellulären GSH-Gehaltes (Lynn *et al.*, 1994). Dieser GSH-Anstieg könnte noch vorhandenes MMS in den Zellen inaktivieren und dadurch ebenfalls zum Absinken der JNK/SAPK-Aktivität nach vier Stunden beitragen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die Beobachtung, daß Zellen, die kein funktionales cJun-Protein exprimieren können, hypersensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien sind (pers. Mitteilung, A. Kolbus, DKFZ, Heidelberg).

Damit konnte ich die Signalwege identifizieren, die die verstärkte Expression von cJun in der Zelle garantieren. Durch die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges wird ein genetisches Programm induziert, daß den Zellen erlaubt aktiv auf umweltbedingte Einflüsse zu reagieren. Dabei kommt es zur Expression von Proteine, die zur Detoxifikation zytotoxischer Xenobiotika notwendig sind, und damit zum Schutz der Zellen gegenüber diesen Substanzen beitragen.



Literatur

- Abate, C., Patel, L., Rauscher III, F. J. und Curran, T. (1990) Redox regulation of Fos and Jun DNA binding activity *in vitro*. *Science*, **249**, 1157-1161
- 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
- Adler, V., Schaffer, A., Kim, J., Dolan, L. und Ronai, Z. (1995) UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26071-26077
- Ames, B. N., Gold, L. S. und Willett, W. C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5258-5265
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987a) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat 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 independent manner. *New Biol.*, **1**, 35-43
- Angel, P. und Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157
- Angel, P. (1995) in Baeuerle, P. (ed.) *Inducible Gene Expression and Cytoplasmic/Nuclear signal Transduction*. Birkhäuser Verlag, Boston, pp. 62-92
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. und Butler, J. (1989) The antioxidant action of N-acetyl cystein: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Free Radical Biol. Med.*, **6**, 593-597
- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1991) IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell*, **64**, 983-993
- Auwerx, J. und Sassone-Corsi, P. (1992) AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1: effect of signal transduction pathways and cell growth. *Oncogene*, **7**, 2271-2280

- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. und Nevins, J. R.** (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, **62**, 659-669
- Bagrodia, S., Dérillard, B., Davis, R. J. und Cerione, R. A.** (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to JNK and p38 MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27995-27998
- Baichwal, V. R. und Tjian, R.** (1990) Control of cJun activity by interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain δ : Differences between v- and c-Jun. *Cell*, **63**, 815-825
- Bandara, L. R. und La Thangue, N. B.** (1991) Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature*, **351**, 494-497
- Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P. und Kouzarides, T.** (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation *in vivo* and CBP binding *in vitro*. *Oncogene*, **11**, 2509-2514
- Barbeau, D., Charbonneau, R., Whalen, S. G., Bayley, S. T. und Branton, P. E.** (1994) Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene*, **9**, 359-373
- Benbrook, D. M. und Jones, N. C.** (1990) Heterodimer formation between CREB and Jun proteins. *Oncogene*, **5**, 295-302
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscot, S. J., Weitraub, H. und Verma, I. M.** (1992) Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell*, **68**, 507-519
- Beranek, D. T., Weis, C. C. und Swenson, D. H.** (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **1**, 595-606
- Beranek, D. T.** (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mut. Res.*, **231**, 11-30
- Bergelson, S., Pinkus, R. und Daniel, V.** (1994) Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res.*, **54**, 36-40
- Berger, N. A.** (1985) Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.*, **101**, 4-15
- Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C. und Busslinger, M.** (1995) Transcriptional activation of the *fra-1* gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3748-3758
- Bernards, R., Houweling, A., Schrier, P., Bos, J. und van der Eb, A.** (1992) Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region 1 plasmids. *Virol.*, **120**, 422-432
- Berstine, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S. und Ephrussi, B.** (1973) Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3899-3903
- Betzholtz, C., Johnson, A., Heldin, C.-H. und Westermarck, B.** (1986) Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6440-6444

- Beullens, D. R., Eynde, A. V., Stalmans, W. und Bollen, M. (1992) The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei. *Biol. Chem.*, **267**, 16538-16544
- 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
- Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. und Vogt, P. K. (1988) *v-Jun* encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell*, **52**, 705-712
- 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 negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, **64**, 573-584
- Branton, P. E., Bayley, S. T. und Graham, F. L. (1985) Transformation by human adenoviruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **780**, 67-94
- Britten, R. A., Green, J. A. und Wahrenius, H. M. (1992) Cellular glutathione (GSH) and glutathione-S-transferases (GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. *Intl. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **24**, 527-531
- Brüsselbach, S., Möhle-Steinlein, U., Wang, Z.-G., Schreiber, M., Lucibello, F. C., Müller, R. und Wagner, E. F. (1995) Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene*, **10**, 79-86
- Burke, D. C. (1981) Methods for enucleation and reconstitution of interferon-producing cells. *Meth. Enzymology*, **79**, 552-557
- Busslinger, M. und Bergers, G. (1994) Identification of AP-1 regulated genes. In: "*The Fos and Jun families of Transcription Factors*". Angel, P. und Herrlich, P. (Eds.), CRC-Press, Inc., pp. 133-150
- Cadena, D. L. und Dahmus, M. E. (1987) Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12468-12474
- Cantley, L., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. und Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction pathways. *Cell*, **64**, 281-302
- Cano, E., Hazzalin, C. A. und Mhadevan, L. C. (1994) Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of *c-fos* and *c-jun*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7352-7362
- Cao, L., Faha, B., Dembski, M., Tsai, L. H., Harlow, E. und Dyson, N. (1992) Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature*, **355**, 176-179
- Cavigelli, M., Li, W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. und Karin, M. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.*, in press
- Charles, C. H., Abler, A. S. und Lau, L. F. (1992) cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene*, **7**, 187-190

- Chasseaud, L.** (1979) The role of glutathione and glutathione-S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, **29**, 175-274
- Chatton, B., Bocco, J. L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y. und Kedinger, C.** (1994) Jun and Fos heterodimerize with ATF α , a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene*, **9**, 375-385
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M. und Nevins, J. R.** (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061
- Chittenden, T., Livingston, D. M. und Kaelin Jr., W. G.** (1991) The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell*, **65**, 1073-1082
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R. und Goodman, R. H.** (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 859-866
- Chu, H. M., Tan, Y., Kokierski, L. A., Balsam, L. B. und Comb, M. J.** (1994) *Mol. Endocrinol.*, **8**, 59-68
- Clamon, G. H.** (1992) Alkylating agents. In: Perry, M. C. (Ed.), *The Chemotherapy Sourcebook*. Williams and Wilkins, Baltimore
- Climent, I. und Levine, R. L.** (1991) Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 371-375
- Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D. S., Jacks, T. und Weinberg, R. A.** (1993) Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.*, **7**, 2329-2404
- Cohen, D. R., Ferreira, P. C. P., Gentz, R., Franza Jr., B. R. und Curran, T.** (1989) The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.*, **3**, 173-184
- Cohen, P.** (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 453-508
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J.-C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. und Gutkind, J. S.** (1995a) The small GTP-binding proteins rac-1 and cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**, 1137-1146
- Coso, O. A., Teramoto, H., Simonds, W. F. und Gutkind, J. S.** (1995b) Signaling from G-protein coupled receptors to c-Jun kinase involves $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3963-3966
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. und Marshall, C. J.** (1994) Activation of MAP kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, **77**, 841-852

- Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N. and Gutkind, J. S. (1995) Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25259-25265
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B. Vanek, P. G. Coso, O. A., Gutkind, J. S. und Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381**, 800-803
- Cyert, M. S. und Thorner, J. (1989) Putting it on and taking it off: Phosphoprotein phosphatase involvement in cell cycle regulation. *Cell*, **57**, 891-893
- Dai, T., Rubie, E., Franklin, C. C., Kraft, A., Gillespie, D. A. F., Avruch, J., Kyriakis, J. M. und Woodgett, J. R. (1995) Stress-activated protein kinases bind directly to the δ domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene*, **10**, 849-855
- Davis, R. J. (1994) MAP kinases: new JNK expands the group. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**, 470-473
- Davis, J. R. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Rep. Dev.*, **42**, 459-467
- Debbas, M. und White, E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev.*, **7**, 546-554
- de Groot, R. P., Schoorlemmer, J., van Genesen, S. T. und Kruijjer, W. (1990) Differential expression of *jun* and *fos* genes during differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3195-3202
- de Groot, R. P., Foulkes, N., Mulder, M., Kruijjer, W., Sassone-Corsi, P. (1991) Positive regulation of jun/AP-1 by E1A. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 192-201
- de Groot, R. P., Schouten, G. J., de Wit, L., Ballou, L. M., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1995) Induction of mitogen-activated p70 S6 kinase by adenovirus E1A. *Oncogene*, **10**, 543-548
- Deng, T. und Karin, M. (1993) JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.*, **7**, 479-490
- Deng, T. und Karin, M. (1994) c-Fos transcriptional activity stimulated by Ha-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature*, **371**, 171-175
- Dérillard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R. J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037
- Dérillard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.-H., Han, J., Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995) Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, 682-685
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M. (1991) Rapid and preferential activation of the *c-jun* gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2804-2811

- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T. und Karin, M. (1992) The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*, **71**, 1081-1091
- Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J. A. und Karin, M. (1993) NF κ B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science*, **261**, 1442-1445
- Devoto, S. H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T. und Nevins, J. R. (1992) A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33^{cdk2} is a component of the E2F-cyclinA complex. *Cell*, **68**, 167-176
- Dieckmann, A. und Krippel, B. (1994) The E1A transcriptional control region is efficiently activated in proliferating tissues of transgenic mice. *Oncogene*, **9**, 2227-2233
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yek, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A., Lee, W.-H. und Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase 1 catalytic subunit. *Genes Dev.*, **7**, 555-569
- Dyson, N. und Harlow, E. (1992) Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv.*, **12**, 161-195
- Egan, C., Jelsma, T. N., Howe, J. A., Bayley, S. T., Ferguson, B. und Branton, P. E. (1988) Mapping of cellular protein-binding products of early region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3955-3959
- Eilers, M., Picard, D. und Yamamoto, K. R. (1989) Chimeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*, **340**, 66-68
- Fairbairn, L. J., Cowling, G. J., Dexter, T. M., Rafferty, J. A., Margison, G. P. und Reipert, B. (1994) Bcl-2 delay of alkylating agent-induced apoptotic death in a murine hemopoietic stem cell line. *Mol. Carcin.*, **11**, 49-55
- Fiddler, W. (1975) The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 352-360
- Franklin, C. C., Sanchez, V., Wagner, F., Woodgett, J. R. und Kraft, A. S. (1992) Phorbol-ester induced phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7247-7251
- Galcheva-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I. H. und Davis, R. J. (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*, **265**, 806-808
- Gardner, A. M. und Johnson, G. L. (1996) Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor α -mediated apoptosis requires ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14560-14566
- 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
- Glover, J. N. und Harrison, S. C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-261
- Gorman, C. M., Moffat, G. T. und Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1057

- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virol.*, **52**, 456-467
- Gulbins, E., Coggshall, K. M., Brenner, B., Schlottmann, K., Linderkamp, O. und Lang, F. (1996) Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26389-26394
- Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B. und Davis, R. J. (1995) Transcription factor ATF-2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Dérijard, B. und Davis, R. J. (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.*, **15**, 2760-2770
- Hagmeyer, B. M., König, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A. J., Herrlich, P. und Angel, P. (1993) Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.*, **12**, 3559-3572
- Hagmeyer, B. M., Duyndam, M. C. A., Angel, P., de Groot, R. P., Verlaan, M., Elfferich, P., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1996) Altered AP-1/ATF complexes in adenovirus-E1-transformed cells due to E1A-dependent induction of ATF-3. *Oncogene*, **12**, 1025-1032
- Hai, T. und Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3720-3724
- Haley, K. P., Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. und Jones, N. C. (1984) Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5734-5738
- Harlow, E., Franza Jr., B. R. und Schley, C. (1985) Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.*, **55**, 533-546
- Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Rütger, U., Wagner, E. F. und Thoenen, H. (1990) Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3899-3903
- Herr, I., van Dam, H. und Angel, P. (1994) Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the *c-jun* promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis*, **15**, 1105-1113
- Herrmann, C. H., Gold, M. O. und Rice, A. P. (1996) Viral transactivators specifically target distinct cellular protein kinases that phosphorylate the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 501-508
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*, **7**, 2135-2148
- 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
- Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S. G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993) A link between ras and metastatic behaviour of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-expression of metastatic variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.*, **53**, 1516-1521
- Holbrook, N. J. und Fornace Jr., A. J. (1991) Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biologist*, **3**, 825-833
- Horvitz, M. S. (1990) In: Fields, B. N. und Knipe, D. M. (Eds.), *Adenoviridae and their replication*. Virology, 2nd Ed., Vol. 2, Raven Press, New York
- Houweling, A., van der Elsen, P. und van der Eb, A. (1980) Partial transformation of primary rat cells by the left most 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology*, **105**, 537-550
- Howe, J. A., Mymryk, J. S., Egan, C., Branton, P. E. und Bayley, S. T. (1990) Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kD protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5883-5887
- Hsu, J. C., Laz, T., Mohn, K. L. und Taub, R. (1991) Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3511-3515
- Hsu, J. C., Bravo, R. und Taub, R. (1992) Interaction among LRF-1, JunB, cJun, and cFos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4654-4665
- Hsu, J. C., Cressman, D. E. und Taub, R. (1993) Promoter-specific trans-activation and inhibition mediated by JunB. *Cancer Res.*, **53**, 3789-3794
- Huang, S. S. und Huang, J. S. (1988) Rapid turnover of the platelet-derived growth factor receptor in sis-transformed cells and reversal by suramin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 12608-12618
- Hunter, T. (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, **64**, 249-270
- Inostroza, J. A., Mermelstein, F. H., Ha, I., Lane, W. S. und Reinberg, D. (1992) Dr I, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*, **70**, 477-489
- Ishizaki, K., Tsujimura, T., Yawata, H., Fujio, C., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. und Ikenaga, M. (1986) Transfer of the *E. coli* O⁶-methylguanine methyltransferase gene into repair-deficient human cells and restoration of cellular resistance to N-methyl-N-nitrosoguanidine. *Mut. Res.*, **166**, 135-141
- Jalink, K., Hordijk, P. L. und Moolenaar, W. H. (1994) Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**, 185-196
- Johnson, G. L. und Vaillancourt, R. R. (1994) Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**, 230-238

- Johnson, N. L., Gardner, A. M., Diener, K. M., Lange-Carter, C. A., Gleavy, J., Jarpe, M. B., Minden, A., Karin, M. Zon, L. I. und Johnson, G. L. (1996a) Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3229-3237
- Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D. und Wisdom, R. (1996b) Cellular transformation and malignancy induced by ras require *c-jun*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4504-4511
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990) Anti-tumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **62**, 1189-1204
- Kaina, B. (1993) Mechanismen der DNA-Reparatur und der Mutagenese. In: Fahrig, R. (Ed.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 65-86
- Kamiya, H., Miura, K., Ohtomo, N., Nishimura, S. und Ohtsuka, E. (1991) Transforming activity of a c-Ha-ras gene containing O-6-methylguanine in codon 12. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 996-1002
- Kang, M. E. und Dahmus, M. E. (1993) RNA polymerase II A and II O have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25033-25040
- Karin, M. und Smeal, T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways: The beginning of the end. *Trends Biol. Sci.*, **17**, 418-422
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483-16486
- Kataoka, H., Hall, J. und Karran, P. (1986) Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary cells by expression of the cloned bacterial DNA repair gene. *EMBO J.*, **5**, 3195-3200
- Kerr, L. D., Holt, J. T. und Matrisian, L. M. (1988) Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*, **242**, 1424-1427
- Keyse, S. M. und Emslie, E. A. (1992) Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature*, **359**, 644-647
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T. D., Feller, S. M., Weichselbaum, R. R. und Kufe, D. W. (1995) Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*, **376**, 785-788
- Kitabayashi, I., Chin, R., Gachelin, G. und Yokoyama, K. (1991) E1A-dependent up-regulation of c-jun/AP-1 activity. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 649-655
- Kitabayashi, I., Kawakami, Z., Chiu, R., Ozawa, K., Matsuoka, T., Toyoshima, S., Umesono, K., Evans, R. M., Gachelin, G. und Yokoyama, K. (1992) Transcriptional regulation of the *c-jun* gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9-cells. *EMBO J.*, **11**, 167-175

- Kitabayashi, I., Eckner, R., Arany, Z., Chiu, R., Gachelin, G., Livingston, D. M. und Yokoyama, K. K. (1995) Phosphorylation of the adenovirus E1A-associated 300 kD protein in response to retinoic acid and E1A during the differentiation of F9 cells. *EMBO J.*, **14**, 3496-3509
- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. und Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, **15**, 5314-5325
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1992) Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-activity without altering AP-1 site occupation *in vivo*. *EMBO J.*, **11**, 2241-2246
- Kortenjann, M. und Shaw, P. E. (1995) The growing family of MAP kinases: regulation and specificity. *Critical Rev. Oncogenesis*, **6**, 99-115
- Kouzarides, T. und Ziff, E. (1988) The role of the leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature*, **336**, 646-651
- Kraus, V. B., Moran, E. und Nevins, J. R. (1992) Promoter-specific trans-activation by the adenovirus E1A 12S product involves separate E1A domains. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4391-4399
- Kroese, E. D., Zeilmaier, M. J., Mohn, G. R. und Meerman, J. H. N. (1990) Preventive action of thioethers towards *in vitro* DNA binding and mutagenesis in *E. coli* K12 by alkylating agents. *Mut. Res.*, **254**, 67-74
- Kuo, M.-L., Chou, Y.-W., Chau, Y.-P. und Meng, T.-C. (1996) Differential induction of apoptosis in oncogene-transformed NIH 3T3 cells by methylmethanesulfonate. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 481-488
- Kypta, R. M., Hemming, A. und Courtneidge, S. A. (1988) Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.*, **7**, 3837-3844
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24313-24316
- Laemmli, U. K. (1979) 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. M. (1988) Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, **334**, 629-631
- Land, H., Parada, L. und Weinberg, R. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, **304**, 596-602
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-1764

- Lange-Carter, C. A., Pleiman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J. und Johnson, G. L.** (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science*, **260**, 315-319
- Lange-Carter, C. A. und Johnson, G. L.** (1994) Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science*, **265**, 1458-1461
- Latinis, K. M. und Koretzky, G. A.** (1996) Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood*, **87**, 871-875
- Lawley, P. D.** (1984) Carcinogenesis by alkylating agents. In: Searl, C. E. (Ed.) *Chemical Carcinogens*. American Chemical Society, Washington D.C., Vol. 1, pp. 325-484
- 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
- Li, P., Wood, K., Mamon, H., Haser, W. und Roberts, T.** (1991) Raf-1: a kinase currently without a cause but not lacking in effects. *Cell*, **64**, 479-482
- Lillie, J. W., Green, M. und Green, M. R.** (1986) An adenovirus E1A protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell*, **46**, 1043-1051
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. und Karin, M.** (1992) Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell*, **70**, 777-789
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.-X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L. und Karin, M.** (1995) Identification of a dual specificity kinase that activates Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*, **268**, 286-290
- Liu, F. und Green, M. R.** (1994) Promoter targeting by adenovirus E1A through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature*, **368**, 520-525
- Liu, Y., Gorospe, M., Yang, C. und Holbrook, N. J.** (1995) Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8377-8380
- Livingstone, C., Patel, G. und Jones, N.** (1995) ATF-2 contains a phosphorylation dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.*, **14**, 1785-1797
- Loveless, A.** (1969) Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature*, **223**, 206-207
- 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., Neuberg, M., Jenuwein, T. und Müller, R.** (1991) Multiple regions of v-Fos protein involved in the activation of AP-1 dependent transcription: Is trans-activation crucial for transformation? *New Biol.*, **3**, 671-676

- Lynn, S., Yew, F. H., Hwang, J. W., Tseng, M. J. and Jan, K. J. (1994) Glutathione can rescue the inhibitory effects of nickel on DNA ligation and repair synthesis. *Carcinogenesis*, **15**, 2811-2816
- Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande-Woude, G. F. und Ahn, N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, **265**, 966-970
- Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-185
- Marshall, N. F. und Price, D. H. (1992) Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2078-2090
- Matsui, M. S. und De Leo, V. A. (1990) Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis*, **11**, 229-234
- McCallan, D. R. (1968) Reaction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-methyl-N-nitroso-p-toluensulfonamide with DNA *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 114-120
- McKay, A. F. (1949) The preparation of N-substituted-N'nitroguanidines by the reaction of primary amines with N-alkyl-N-nitroso-N'-nitroguanidines. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1968-1970
- Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal. Applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.*, **51**, 155-194
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Dérillard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L. und Karin, M. (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. und Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157
- Mirvish, S. S. (1975) Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **31**, 325-351
- Mitchell, E. P. und Schein, P. S. (1992) Nitrosourea. In: Perry, M. C. (Ed.) *The Chemotherapy Sourcebook*, Williams und Wilkins, Baltimore
- Mitra, G., Pauly, G. T., Kumar, R., Pei, G. K., Hughes, S. H., Moschel, R. C. und Barbacid, M. (1989) Molecular analysis of O⁶-substituted guanine-induced mutagenesis of ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8650-8654
- Mizumoto, K., Glascott, P. A. Jr. und Farber, J. L. (1993) Roles for oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of cultured hepatocytes by methyl methanesulfonate. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1811-1818
- Montecarlo, F. S. und Vogt, P. K. (1993) A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6726-6730

- Moolenaar, W. H.** (1995a) Lysophosphatidic acid signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 203-210
- Moolenaar, W. H.** (1995b) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12949-12952
- Moran, E., Zerler, B., Harrison, T. M. und Mathews, M. B.** (1986) Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3470-3480
- Moran, E.** (1993) Interaction of adoviral proteins with pRB and p53. *FASEB-J.*, **7**, 880-885
- Morgan, I. M., Asano, M., Havarstein, L. S., Ishikawa, H., Hiiragi, T., Ito, Y. und Vogt, P. K.** (1993) Amino acid substitution modulate the effect of Jun on transformation, transcriptional activation and DNA replication. *Oncogene*, **8**, 1135-1140
- Moriguchi, T., Kawasaki, H., Matsuda, S., Gotoh, Y. und Nishida, E.** (1995) Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinases/c-Jun amino-terminal kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12969-12972
- Morley, S. und Thomas, G.** (1991) Intracellular messengers and the control of protein synthesis. *Pharmacol. Ther.*, **50**, 291-319
- Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W. und Arkininstall, S.** (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4319-4326
- Nakabeppu, Y., Ryder, K. und Nathans, D.** (1988) DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell*, **55**, 907-915
- Natarajan, A. T., Simons, J. W. I. M., Vogel, E. W. und van Zeeland, A. A.** (1984) Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister-chromatide exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, **128**, 31-40
- Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F. und Johnson, M.** (1991) Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene*, **6**, 1583-1592
- Neuberg, M., Adamkiewicz, J., Hunter, J. B. und Müller, R.** (1989) A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP-1 binding site. *Nature*, **341**, 243-245
- Nevins, J. R.** (1992) E2F: a link between the Rb tumor supressor protein and viral oncoproteins. *Science*, **258**, 424-429
- Noguchi, T., Metz, R., Chen, L., Mattei, M. G., Carrasco, D. und Bravo, R.** (1993) Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a non-transmembrane protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5195-5205
- O'Brian, T., Hardin, S., Greenleaf, A. und Lis, J. T.** (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature*, **370**, 75-77

- Oehler, T. und Angel, P. (1992) A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic-blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 5508-5515
- Oehler, T., Pintzas, A., Stumm, S., Darling, A., Gillespie, D. und Angel, P. (1993) Mutation of a phosphorylation site in the DNA binding domain is required for redox-independent transactivation of AP-1-dependent genes by v-Jun. *Oncogene*, **8**, 1141-1147
- 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: expression of AP-1 activity. *Cell*, **62**, 527-538
- Olson, M. F., Ashworth, A. und Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac, Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **269**, 1270-1272
- O'Shea, E., Rutkowski, R. und Kim, P. S. (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell*, **68**, 699-708
- Osterman-Golkar, S. (1974) Reaction kinetics of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat. Res.*, **24**, 219-226
- Paik, W. K., Kim, S., Magee, P. N. und Lotlikar, P. D. (1984) Alkylation of protein by methyl methanesulfonate and 1-methyl-1-nitrosourea *in vitro*. *Cancer Lett.*, **23**, 9-17
- Papavassiliou, A. G., Treier, M. und Bohmann, D. (1995) Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J.*, **14**, 2014-2019
- Perricaudet, M., Akusjarvi, G., Virtanen, A. und Petterson, U. (1979) Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature*, **281**, 694-696
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P. und Grosso, P. (1985) N-Nitroso compounds: Occurrence, biological effects and relevance to human cancer, *IARC Scientific Publication no.57*. IARC, Lyon, pp. 627-655
- Pletsa, V., Gentil, A., Margot, A., Armier, J., Kyrtopoulos, S. A. und Sarasin, A. (1992) Mutagenesis by O⁶meG residues within codon 12 of the human Ha-ras proto-oncogene in monkey cells. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4897-4901
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J. R. (1991) Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**, 670-674
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993) UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.*, **12**, 1005-1012
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7420-7426
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A., Barrett, T., Dérillard, B. und Davis, R. J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1247-1255

- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenberry, D., Korsmeyer, S. und White, E. (1992) The adenovirus E1A proteins induce apoptosis which is inhibited by the E1B 19K and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7742-7746
- Rauscher III, F. J., Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. und Franza Jr., B. R. (1988a) Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene. *Science*, **240**, 1010-1016
- Rauscher III, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. und Spiegelman, B. (1988b) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*, **52**, 471-480
- Ray, L. B. und Sturgill, T. W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serin/threonin kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1502-1506
- Rozeck, D. und Pfeifer, G. P. (1993) In vivo protein-DNA interactions at the *c-jun* promotor: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5490-5499
- Ruley, H. E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*, **304**, 602-606
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E. und Nathans, D. (1989) JunD: a third member of the Jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1500-1503
- Ryseck, R.-P., Hirai, S. I., Yaniv, M. und Bravo, R. (1988) Transcriptional activation of *c-jun* during G₀/G₁ transition in mouse fibroblasts. *Nature*, **334**, 535-537
- Ryseck, R. P. und Bravo, R. (1991) cJun, JunB and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene*, **6**, 533-542
- Sachsenmaier, C. und Radler-Pohl, A. (1994) in Angel, P. E. und Herrlich, P. A. (eds.) *The Fos and Jun families of transcription factors*. CRC-Press, Boca-Raton, pp. 61-70
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994) Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, **78**, 963-972
- Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M. und Zon, L. I. (1994) Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*, **372**, 794-798
- 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., Ransone, L. J., Lamph, W. W. und Verma, I. M. (1988) Direct interaction between Fos and Jun nuclear oncoproteins: role of the "leucine zipper" domain. *Nature*, **336**, 692-695
- Schneider, J. F., Fisher, F., Goding, C. R. und Jones, N. C. (1987) Mutational analysis of the adenovirus E1A gene: The role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.*, **6**, 2053-2060

- Scholer, H. R., Ciesiolka, T. und Gruss, P. (1991) A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell*, **66**, 291-304
- Schönthal, A. und Feramisco, J. R. (1990) Different promoter elements are required for the induced expression of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes by the v-mos product. *New Biol.*, **2**, 143-150
- Schuermann, M., Hunter, J. B., Hennig, G. und Müller, R. (1991) Non-leucine residues in the leucine repeats of Fos and Jun contribute to the stability and determine the specificity of dimerization. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 739-746
- Schüle, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Bolado, J., Pike, J. W. und Evans, R. M. (1990a) Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*, **61**, 497-504
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M. und Evans, R. M. (1990b) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, **62**, 1217-1226
- Schrier, P., Bernards, R., Vaessen, R., Houweling, A. und van der Eb, A. (1983) Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature*, **305**, 771-775
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L. S. und Shenk, T. (1991) Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*, **67**, 377-388
- Shibuya, T. und Morimoto, K. (1993) A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mut. Res.*, **297**, 3-38
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M. und Chittenden, T. (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclinA complex in a cell-regulated manner. *Cell*, **68**, 157-166
- Singer, B. (1975) The chemical effects of nucleic acids alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **15**, 219-284
- Singer, B. (1985) *In vivo* formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents. *Environ. Health. Persp.*, **62**, 41-48
- Singer, B. und Grunberger, D. (1983) Molecular biology of mutagens and carcinogens. Plenum Press, New York
- Sistonen, L., Hölttä, E., Mäkela, T. P., Keski-Oja, J. und Atilato, K. (1989) The cellular response to induction of the p21c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of *Jun* gene expression. *EMBO J.*, **8**, 815-822
- Sluss, H. K., Barrett, T., Dérijard, B. und Davis, R. J. (1994) Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8376-8384
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. und Karin, M. (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, **354**, 494-496

- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover, B. A., Heidecker, G., Rapp, U. R. und Karin, M. (1992) Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3507-3513
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988) Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40
- Spencer, C. A. und Groudine, M. (1990) Transcriptional elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene*, **5**, 777-785
- Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H. J. (1992) Ultraviolet radiation-induced *c-jun* gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 409-415
- Strickland, S. und Mahdavi, M. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, **15**, 393-403
- Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Fauman, E. B., Zhang, Z. Y., Dixon, J. E. und Saper, M. A. (1994) Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature*, **370**, 571-575
- Sukumar, S., Notario, V., Merin-Zanca, D. und Barbacid, M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of Ha-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, **306**, 658-661
- Sun, H., Charles, C. M., Lau, L. und Tonks, N. K. (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell*, **75**, 487-493
- Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1992) Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev.*, **6**, 1810-1819
- 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
- Usheva, A., Horikoshi, N., Lewis, B., Weinmann, R. und Shenk, T. (1994) Transcriptional activation by the adenovirus E1A protein: anti-repression. *J. Cell. Biochem.* [Suppl.], **18C**, 206
- van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1990) Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5857-5864
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. und van der Eb, A. J. (1993) Heterodimer formation of c-Jun and ATF-2 is responsible for induction of c-Jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.*, **12**, 479-487
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-Jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.*, **14**, 1798-1811

- van den Elsen, P. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983) Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1a. *Virology*, **131**, 242-246
- van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1992) in: Doerfler, W. (Ed.) *Malignant transformation by DNA viruses*. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 115-140
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Halmovitz-Friedman, A., Fuks, Z. und Kolesnick, R. N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, **380**, 75-79
- Vogt, P. K. und Bos, T. J. (1990) Jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.*, **55**, 1-35
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. und Cooper, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214
- von Hofe, E., Fairbairn, L. und Margison, G. P. (1992) Relationship between O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity and N-methyl-N'-nitrosoguanidine-induced mutation, transforming, and cytotoxicity in C3H/10T^{1/2} cells expressing exogenous alkyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11199-11203
- Wadell, G. (1984) in: Doerfler, W. (Ed.) *Current topics of microbiology and immunology*. Springer Verlag, Vol. 110, pp. 73-142
- Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M. und Brenner, D. A. (1994) Tumor necrosis alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26396-26401
- White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P. und Denton, A. (1991) The adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J. Virol.*, **65**, 2968-2978
- White, E. (1993) Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **204**, 30-39
- Whitmarsh, A. J., Shore, P., Sharrocs, A. D. and Davis, R. J. (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*, **269**, 403-407
- Whyte, P., Williamson, N. M. und Harlow, E. (1989) Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*, **56**, 67-75
- Wogan, G. N. (1975) Nitrosamines and nitrosamides: Environmental occurrence and toxicological significant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 323-324
- Wu, Z., Chan, C.-L., Eastman, A. und Bresnick, E. (1991) Expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in Chinese hamster ovary cells and restoration of cellular resistance to certain N-nitroso compounds. *Mol. Carcinogenesis*, **4**, 482-488
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.-C. und Curran, T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, **11**, 3323-3335

- Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R. und Templeton, D. J.** (1994) Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*, **372**, 798-800
- Yang-Yen, H.-F., Chiu, R. und Karin, M.** (1990) Elevation of AP-1 activity during F9 cell differentiation is due to increased *c-jun* transcription. *New Biol.*, **2**, 351-361
- Yayon, A. und Klagsbrun, M.** (1990) Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5346-5350
- Zerial, M., Toshi, L., Ryseck, R.-P., Schuermann, M., Müller, R. und Bravo, R.** (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fosB, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.*, **8**, 805-813
- Zhang, Z. Y., Wang, Y., Wu, L., Faumann, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A. und Dixon, J. E.** (1994) The Cys(X)₅Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochem.*, **33**, 15266-15270
- Zinck, R., Cahill, M. A., Kracht, M., Sachsenmair, C., Hipskind, R. A. und Nordheim, A.** (1995) Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4930-4938