

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER
NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN GESAMTFAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT
HEIDELBERG

vorgelegt von

Diplom-Biologin **Christine-Luise Munz**
aus **Liebling/Rumänien**

Tag der mündlichen Prüfung :.....

Thema:

**MOLEKULARE MECHANISMEN DER
TRANSKRIPTIONELLEN AKTIVIERUNG DURCH DIE
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN C-JUN UND V-JUN**

Gutachter:

Prof. Dr. Dirk Bohmann
Prof. Dr. Ekkehard K. F. Bautz

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Transkriptionsfunktion von c-Jun und v-Jun in drei verschiedenen Ansätzen untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität von v-Jun, im Gegensatz zu den sauren Transkriptionsfaktoren VP16, GCN4 und Hap4, in *S.cerevisiae* unabhängig vom SAGA- und Ada-Komplex ist. Weder die Funktion des SAGA-Komplexes Histone zu acetylieren, noch seine Funktion als Brückenprotein sind für die transkriptionelle Aktivierung durch v-Jun notwendig. Obwohl aufgrund von *in-vivo* Konkurrenzexperimenten ein oder mehrere gemeinsame Mechanismen postuliert wurden, über den oder die sauren Transaktivatoren wirken (Oehler et al., 1992), legen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse dar, dass die einzelnen Transaktivierungswege nicht von allen Mitgliedern dieser Klasse genutzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Proteine, die mit der Transaktivierungsdomäne des v-Jun Proteins interagieren und in die transkriptionelle Aktivierung involviert sind, mit Hilfe des „two-hybrid screens“ isoliert werden. Als Interaktionspartner wurden in einer HeLa cDNA-Bank PAG und NKEF-B identifiziert. Beide Proteine weisen ein hohes Maß an Homologie auf und kontaktieren spezifisch die Transaktivierungsdomäne von v-Jun. Die Interaktion wird durch die δ -Domäne im c-Jun Protein verhindert. Koexpression von PAG und v-Jun führt zu einer spezifischen Inhibition der v-Jun Aktivität, die auf einer erhöhten Degradationsrate beruht. Zusätzlich zu PAG und NKEF-B konnten in dem „two-hybrid screen“ keine Proteine isoliert werden, die in der Lage sind die transkriptionelle Aktivierung durch v-Jun oder c-Jun weiterzuleiten und damit Koaktivatorfunktion besitzen.

In Teil 3 der Arbeit lag das Augenmerk deshalb auf Proteinen, deren Funktion als Koaktivator bereits bekannt war. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die TFIID-Untereinheit hTAFII55 die c-Jun vermittelte transkriptionelle Aktivierung stimuliert und mit c-Jun und v-Jun interagiert. hTAFII55 interagiert mit der DNA-Bindedomäne von v-Jun und c-Jun. Diese Interaktion wird gelöst, sobald die Jun-Proteine an DNA binden. Zwei weitere hTAFII55 Interaktionsregionen befinden sich in der c-Jun bzw. v-Jun Transaktivierungsdomäne. Die erste Region umspannt die saure Domäne 1 und 2. Die zweite liegt in der sauren Domäne 3. Die Interaktion von hTAFII55 mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des c-Jun Proteins. hTAFII55 interagiert präferentiell mit DNA-gebundenem c-Jun, welches in der Transaktivierungsdomäne an Position Ser63/73 phosphoryliert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte damit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen c-Jun und einer Komponente der Transkriptionsmaschinerie, durch Phosphorylierung des c-Jun N-Terminus stimuliert werden kann.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Transkriptionelle Aktivierung RNA-Polymerase II abhängiger Gene	1
1.1.1 Die Stimulation der Transkription über die Rekrutierung des PIC-Komplexes	2
1.1.2 Der Beitrag der Histon Acetylierung zur Regulation der Transkription	4
1.2 Der Transkriptionfaktor AP-1	6
1.2.1 Familie der Jun Proteine	8
1.2.2 Die Transaktivierungsfunktion von c-Jun und v-Jun	9
2. ZIELSETZUNG	12
3. MATERIAL	13
3.1 Chemikalien und Bezugsquellen	13
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	16
3.3 Enzyme	17
3.4 Radiochemikalien	17
3.5 Antikörper	17
3.6 Nährmedien für die Bakterienkultur	18
3.7 Lösungen und Puffer	18
3.8 Bakterienstämme	18
3.9 Hefestämme	19
3.10 Zelllinien	19
3.11 Oligonucleotide	19

4. METHODEN	21
4.1 Zellkultur	21
4.1.1 Passagieren von Zellen	21
4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	21
4.1.3 Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen (Graham und van der Eb, 1973)	22
4.2 Analyse von Nucleinsäuren	22
4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	22
4.2.2 Phenol/Chloroform Extraktion	22
4.2.3 Fällung von Nucleinsäuren	23
4.3 DNA-Präparation	23
4.3.1 Plasmid DNA Mini-Präparation	23
4.3.2 Plasmid-DNA Maxi-Präparation mittels Ionenaustauscher-Säulenchromatographie	23
4.4 Klonierungstechniken	24
4.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen	24
4.4.2 Dephosphorylierung von DNA	24
4.4.3 Phosphorylierung von Oligonucleotiden und Linkern	25
4.4.4 Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen	25
4.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten	25
4.4.6 Herstellung chemo-kompetenter E.coli Bakterien	26
4.4.7 Transformation kompetenter Bakterien	26
4.4.8 Herstellung elektro-kompetenter E.coli Bakterien	27
4.5 DNA-Gelelektrophorese	27
4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese	27
4.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
4.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
4.5.4 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	29
4.6 Sonstige DNA-Methoden	29
4.6.1 Southern-Blot	29
4.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase-chain-reaction", PCR)	30
4.6.3 Sequenzierung von DNA	30

4.7	RNA-Methoden	31
4.7.1	Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacci, 1987)	31
4.8	Protein-Methoden	32
4.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al. (1951)	32
4.8.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	32
4.8.3	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE	33
4.8.4	Immunoblot-Analyse von Proteinen ("Western-Blot")	33
4.8.5	Immunpräzipitation von Proteinen	34
4.8.6	Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität	35
4.8.7	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen	36
4.8.8	GST-pulldown-Assay	37
4.8.9	Herstellen der Na ₃ VO ₄ -Stocklösung (Kypta et al., 1988)	38
4.8.10	Präparieren von Gesamtzellextrakten	38
4.8.11	<i>in-vitro</i> -Translation im TNT-System (Promega)	38
4.9	Hefetechniken	39
4.9.1	Kultivieren der Hefen	39
4.9.2	Transformation von Plasmid DNA	39
4.9.3	Präparation von Plasmid-DNA	40
4.9.4	Präparation genomischer DNA	40
4.9.5	Bestimmen der β -Galaktosidase-Aktivität	41
	<i>ONPG-Test aus Flüssigkultur</i>	41
	<i>X-Gal-Test auf Platte</i>	42
4.9.6	Durchführung eines „Two-hybrid screens“	42
5.	ERGEBNISSE	44
5.1	Die Rolle des SAGA Komplexes in der transkriptionellen Aktivierung durch v-Jun	44
5.1.1	Die Aktivität des v-Jun Proteins ist in <i>S.cerevisiae</i> unabhängig vom SAGA-Komplex	44
5.2	Isolation von Interaktionspartnern der v-Jun Transaktivierungsdomäne im „two-hybrid screen“	48

5.2.1	Bestimmung der Aktivität der einzelnen v-Jun Transaktivierungsdomänen in <i>S.cerevisiae</i>	48
5.2.2	Isolation von PAG als Interaktionspartner von v-Jun in einem two-hybrid screen	53
5.2.3	PAG und NKEF-B interagieren spezifisch mit der v-Jun Transaktivierungsdomäne	56
5.2.4	Die c-Jun δ -Domäne inhibiert die Interaktion von PAG mit der Jun Transaktivierungsdomäne	58
5.2.5	PAG inhibiert die v-Jun Aktivität in F9-Teratokarzinomazellen	59
5.2.6	Die PAG vermittelte Inhibition von v-Jun ist abhängig von der v-Jun Transaktivierungsdomäne	61
5.2.7	Die Expression von PAG in F9-Zellen führt zu verminderten v-Jun Proteinmengen, die sich auf erhöhte Degradation zurückführen lassen - ein Effekt, der unabhängig ist von der Antioxidantfunktion des PAG Proteins	61
5.3	Die Rolle von hTAFII55 in der c-Jun vermittelten Transaktivierung	65
5.3.1	Überexpression von hTAFII55 erhöht das c-Jun Transaktivierungspotential in HEK293 Zellen	65
5.3.2	c-Jun interagiert mit hTAFII55	67
5.3.3	hTAFII55 interagiert mit der bZip Region des c-Jun Proteins	69
5.3.4	Für die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip-Domäne ist der Leucin-Zipper essentiell.	72
5.3.5	<i>In-vitro</i> interagiert DNA-gebundenes c-Jun nicht mit hTAFII55	73
5.3.6	<i>In-vitro</i> interagiert rekombinantes hTAFII55 nicht mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne	74
5.3.7	<i>In-vivo</i> bindet hTAFII55 an die Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins	77
5.3.8	hTAFII55 erkennt zwei Interaktionsflächen in der c-Jun Transaktivierungsdomäne	79
5.3.9	Die c-Jun bZip Domäne ist für eine effiziente c-Jun Aktivierung durch hTAFII55 erforderlich	79
5.3.10	<i>In vivo</i> interagiert hTAFII55 präferentiell mit phosphoryliertem, DNA gebundenem c-Jun	83

6. DISKUSSION	85
6.1 Die Rolle des SAGA-Komplexes in der v-Jun vermittelten Aktivierung der Transkription	85
6.2 Isolierung von Interaktionspartnern der v-Jun Transaktivierungsdomäne	88
6.2.1 Im Vergleich zu den sauren Regionen 1 und 3 der v-Jun Transaktivierungsdomäne zeigt Region 2 in <i>S.cerevisiae</i> die schwächste Aktivität	88
6.2.2 Isolierung von PAG und NKEF-B im „two-hybrid screen“ als Interaktionspartner der v-Jun Transaktivierungsdomäne	90
6.2.3 PAG inhibiert die Aktivität von v-Jun	91
6.2.4 Überexpression von PAG in F9-Zellen führt zu einer erhöhten v-Jun Abbaurrate	92
6.3 Die Rolle von hTAFII55 in der c-Jun abhängigen Aktivierung der Transkription	94
6.3.1 hTAFII55 stimuliert c-Jun vermittelte transkriptionelle Aktivierung und interagiert mit der c-Jun DNA-Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne	94
6.3.2 Die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun DBD wird nach Bindung von c-Jun an DNA gelöst	99
6.3.3 hTAFII55 interagiert präferentiell mit S63/73-phosphoryliertem c-Jun, welches an DNA gebunden ist	100
7. ABKÜRZUNGEN	104
8. LITERATURVERZEICHNIS	106

1. EINLEITUNG

1.1 Die Transkriptionelle Aktivierung RNA-Polymerase II abhängiger Gene

Zellen müssen im Lauf ihrer Entwicklung und als Antwort auf extrazelluläre Stimuli in der Lage sein, die Expression ihrer Gene differentiell zu regulieren. Die Regulation der Genexpression erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription.

Das Enzym, das für die DNA-gesteuerte Synthese der RNA zuständig ist, ist die RNA-Polymerase. Eukaryontische Nuclei enthalten drei RNA-Polymerasen, die sich durch die Synthese verschiedener RNA-Typen voneinander unterscheiden. Die RNA-Polymerase I synthetisiert die Vorläufer der meisten ribosomalen RNAs (rRNAs). Die Vorläufer der 5S-rRNA, der tRNA und weiterer kleiner nucleärer und zytosolischer RNAs werden von der RNA-Polymerase III synthetisiert während die RNA-Polymerase II mRNA kodierende Gene transkribiert.

Die Synthese der mRNA ist abhängig von zwei verschiedenen DNA-Elementen: dem Minimalpromotor und dem Enhancer.

Der Minimalpromotor bestimmt den Transkriptionsstartpunkt. An ihn bindet das RNA-Polymerase Holoenzym. Er setzt sich typischerweise aus einer konservierten AT-reichen Sequenz (TATA-Box), dem Initiator-Element (Inr), der Konsensussequenz GGT/CCAATCT (CAAT-Box) und einem GC-reichen Abschnitt zusammen (Zawel und Reinberg, 1995; Dierks et al., 1983; Efstradiatis et al., 1980; Corden et al., 1980; Myers et al., 1987; Karin et al., 1984; Smale und Baltimore, 1989). Die dargestellten Motive sind keine absolut notwendigen Promotorelemente, sie können aber durchaus gemeinsam auftreten.

Enhancer haben die Aufgabe Induzierbarkeit oder Gewebsspezifität zu vermitteln. Sie bestehen aus einem Arrangement kurzer Sequenzmotive, und werden von Gen-

spezifischen transkriptionellen Regulatoren (Transkriptionsfaktoren) erkannt (zur Übersicht Burley und Roeder, 1996; Verrijzer und Tjian, 1996).

Die Transkription RNA-Polymerase II abhängiger Gene ist das Ergebnis eines Zusammenspiels von generellen Transkriptionsfaktoren (GTF), transkriptionellen Aktivatoren (Transaktivatoren) und sogenannten Koaktivatoren, Kofaktoren oder Brückenproteinen (zur Übersicht: Kaiser und Meisterernst, 1996). Die Transkriptionsprozess kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden: die Bildung eines Präinitiationskomplexes, die Initiation, Promotor clearance, Elongation und Termination. Transkriptionelle Aktivatoren steigern die Transkriptionsrate, indem sie die Effizienz der einzelnen Prozesse erhöhen. Für die Regulation ist vor allem der primäre, initiale Schritt der Transkription von Bedeutung. Zwei Modelle versuchen die Initiation zu erklären. Im ersten Modell führt die Bindung von TBP (**T**A**T**A-Box **B**inding **P**rotein) an die TATA-Box zur Rekrutierung der restlichen GTF, wie TFIIB, TFIIF, TFIIH und TFIIIE und der RNA-Polymerase II. Im zweiten Modell binden alle diese Faktoren als ein bereits bestehender RNA-Polymerase II - Holoenzymkomplex an den Promotor. Der Komplex aus DNA und dem RNA-Polymerase II Holoenzym wird als Präinitiationskomplex (PIC) bezeichnet. Die Bildung dieses Komplexes stellt einen limitierenden Schritt in der Initiation der Transkription dar (Klages und Strubin, 1995).

1.1.1 Die Stimulation der Transkription über die Rekrutierung des PIC-Komplexes

Eine große Anzahl verschiedener Experimente deutet darauf hin, dass transkriptionelle Aktivatoren die Transkription direkt über die Rekrutierung des PIC-Komplexes stimulieren können (Ptashne und Gann, 1997). Dies kann über mehrere Wege erfolgen: einerseits können transkriptionelle Aktivatoren die Rate des TFIID-TFIIA-Rekrutierung erhöhen, andererseits können sie aber auch den Aufbau der Holoenzymkomponenten am Promotor stimulieren (Kaiser et al., 1995; Kobayashi et al., 1998; Choy und Green, 1993; Klages und Strubin, 1995). Auch wenn TBP oder TAFs (**T**BP **A**ssociated **F**actors) über die Fusion an eine DNA-Bindedomäne artifiziell an Promotoren rekrutiert werden, kann die Initiationsrate gesteigert werden (Keaveney und Struhl, 1998).

Die Interaktionen die bei der Rekrutierung des PIC eine Rolle spielen, sind vielfältiger Natur. Mechanistisch kommt zum einen die direkte Interaktion mit den generellen

Transkriptionsfaktoren in Frage. Zum Beispiel bindet das virale Protein VP16 an TBP (Stringer et al., 1990), TFIIB (Lin und Green, 1991; Roberts et al., 1993; Gupta et al., 1996) und TFIID (Xiao et al., 1994). TFIIB wurde weiterhin als Ziel des Tumorsuppressor-Genprodukts p53 (Xiao et al., 1994) und eines artifiziellen glutaminreichen Transaktivators (Colgan et al., 1995) identifiziert. Zum anderen benötigen einige Transaktivatoren Koaktivatoren. p300/CBP ist ein relativ unspezifischer Koaktivator, der die verschiedensten transkriptionellen Aktivatoren, darunter c-Myb, YY1, TR α (Thyroid Hormone Receptor), ER (Estrogen Receptor) und CREB (CRE Binding Protein) erkennt (Li et al., 1999; Austen et al., 1997; Kamei et al., 1996; Chakravarti et al., 1996; Lundblad et al., 1995; Dai, P. et al., 1996). Der Koaktivatorkomplex p52/54 interagiert mit den sauren Transkriptionsfaktoren der Jun Familie und VP16 (Oehler und Angel, 1992). Proteine der SRC/NcoA Familie dienen als Koaktivatoren für nucleäre Rezeptoren (Glass et al., 1997). Rekonstituierte *in-vitro* Transkription mit fraktionierten basalen Transkriptionsfaktoren aus *Drosophila* zeigte, dass für die Aktivierung der Transkription durch den glutaminreichen Transkriptionfaktor Sp-1, die TAFs essentiell sind (Pugh und Tijan 1990). Daher wurde vermutet, dass zumindest einige der TAFs als Koaktivatoren dienen. Es konnte eine Reihe von Interaktionen zwischen TAFs und Aktivatorproteinen nachgewiesen werden. SP-1 interagiert mit dTAF110 (Hoey et al., 1993). hTAFII40/60 interagiert mit p53 (Thut et al., 1995; Burley und Roeder, 1996). hTAFII31 wird ebenfalls von p53, aber zusätzlich noch von VP16 kontaktiert (Lu und Levine, 1995; Uesugi et al., 1997; Thut et al., 1995; Goodrich et al., 1993). ER interagiert wiederum mit hTAFII30 (Jacq et al., 1994). hTAFII55 ist besonders interessant, da es mit Transaktivatoren der unterschiedlichen Klassen interagiert, darunter Sp1, YY1, USF, CTF, E1A, VitaminD3- und Thyroid-Hormon-Rezeptor (Chiang und Roeder, 1995; Lavigne et al., 1999; Austen et al., 1997)

Koaktivatoren müssen ihrerseits das Transaktivierungssignal weiterleiten, indem sie mit den GTFs interagieren. PC4 interagiert mit dem TFIID-Komplex (Kretzschmar et al., 1994), die TAFs kontaktieren TBP (Dynlacht et al., 1991) und CBP bindet an TBP und TFIIB (Swope et al., 1996; Kwok et al., 1994).

1.1.2 Der Beitrag der Histon Acetylierung zur Regulation der Transkription

Transkription kann aber auch durch Veränderung der Chromatinstruktur reguliert werden. Das Chromatin ist aus sich wiederholenden Nucleosomalen Einheiten aufgebaut. Eine nucleosomale Einheit besteht aus dem nucleosomalen Core (146 bp DNA, die 1,65 mal um das Histon-Oktamer gewunden sind), dem Verbindungshiston H1 und der DNA, die sich zwischen den einzelnen nucleosomalen Cores befindet. Das Histon-Oktamer wiederum setzt sich aus einem zentralen Tetramer (bestehen aus jeweils zwei Histon-Molekülen H3 und H4) und zwei H2A/H2B Heterodimeren zusammen (Kornberg und Thomas, 1974; Workman und Kingston, 1998). Nucleosomen inhibieren die Bindung der meisten Transkriptionsfaktoren und dadurch die Bildung des Präinitiationskomplexes. Die Histone des nucleosomalen Cores können an ihren N-Termini in Form von Phosphorylierung und Acetylierung modifiziert werden. Acetylierung neutralisiert die positiven Ladungen der N-terminalen Lysinreste, während Phosphorylierung negative Ladungen an dem konservierten Serin an Position 10 des Histon H3 einführt. Die Acetylierung von Nucleosomen hängt in Eukaryonten mit transkriptioneller Aktivität zusammen. So wurde beobachtet, dass Chromatin transkriptionell aktiver Gene acetylierte Histone enthält (Sealy und Chalkley, 1978; Hebbes et al., 1988). Die Neutralisierung der positiven Ladung der Lysinreste in den N-Termini der Histone durch Acetylierung führt zu einer verminderten Affinität der Histone für DNA und verändert dadurch die nucleosomale Konformation (Norton et al., 1989). Als Konsequenz wird die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglicher (Lee et al., 1993; Vettese-Dadey et al., 1996).

Es wurde bereits eine Reihe von Proteinen mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität, sogenannte HATs (**H**iston-**A**cetyl-**T**ransferasen) nachgewiesen. Dazu gehören zum einen CBP/p300 und TAF130/250. TAF130/250 ist eine Untereinheit des TFIID-Komplexes und somit eine Grundkomponente der RNA-Polymerase II - Transkriptionsmaschinerie in allen Eukaryonten (Mizzen et al., 1996). CBP/p300 wurde zunächst als Koaktivator beschrieben, der mit einer großen Vielzahl verschiedener transkriptioneller Aktivatoren interagiert (Janknecht und Hunter 1996). Es ist eng mit dem RNA-Polymerase II - Holoenzym assoziiert und kann daher als eine eher generelle Komponente der Transkriptionsmaschinerie betrachtet werden (Nakajima et al., 1997). P/CAF ist eine weitere Histon-Acetylase, die im Komplex mit CBP/p300 vorliegt (Yang et al., 1996). Histon Acetylaseaktivität besitzen auch verschiedene Koaktivatoren, wie beispielsweise

ACTR und SRC-1, die mit nucleären Rezeptoren assoziieren können (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997).

Die oben dargestellten Proteine kommen ausschließlich in höheren Eukaryonten vor. Hingegen wurden in allen Eukaryonten Homologe der Acetyltransferase GCN5 beschrieben. Zunächst aus *Tetrahymena* isoliert, wurden später Homologe auch in *S.cerevisiae* und Mensch nachgewiesen (Brownell et al., 1996; Cadau et al., 1996). Es ist die katalytische Untereinheit zweier HAT-Komplexe, dem Ada- und dem SAGA-Komplex (Eberharter et al., 1999). GCN5 wurde ursprünglich aufgrund seiner funktionellen Interaktion mit dem transkriptionellen Aktivatorprotein GCN4 und mit der Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 in einem genetischen Ansatz gefunden (Georgakopoulos, 1992; Marcus et al., 1994).

Der Ada-Komplex besitzt eine molekulare Masse von 0,8 MDa und besteht neben der katalytischen Untereinheit GCN5, aus den Adaptorproteinen Ada2 und Ada3. Der SAGA-Komplex setzt sich aus Teilen des Ada-Komplexes und weiteren, sogenannten Spt-Untereinheiten zusammen. Dazu gehören Spt3, Spt7, Spt8 und Spt20. Neben seiner Funktion als Histon-Acetyltransferase, die er mit dem Ada-Komplex gemeinsam hat, besitzt der SAGA-Komplex weiterhin die Fähigkeit über seine Spt-Komponenten TBP zu kontaktieren (Eisenmann et al., 1992; Eisenmann et al., 1994; Roberts und Winston, 1997; Madison et al., 1997). Genetische Analysen verschiedener Komponenten der SAGA- und Ada-Komplexe lieferten Hinweise, dass ihre Funktion zum Teil von der Interaktion mit sauren Transaktivatoren abhängt (Hampsey, 1997). Tatsächlich interagiert der Transkriptionsfaktor VP16 mit dem SAGA-Komplex und kann dadurch HAT-Aktivität an Nucleosomen dirigieren, was in Histonacetylierung und damit auch in transkriptioneller Aktivierung resultiert (Utley et al., 1998; Berger et al., 1992; Pina et al., 1993; Rhea et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Vignali et al., 2000).

Ein Weg der transkriptionellen Aktivierung könnte daher die Rekrutierung von HAT-Komplexen durch transkriptionelle Aktivatoren an Nucleosomen sein. Die darauf folgende Acetylierung der Histone würde die Bindung der Aktivatoren wiederum verstärken und weiterhin die Bildung des Präinitiationskomplexes erlauben. Neuere Daten geben aber Hinweise darauf, dass die Acetylierung der Histone auch zu einer direkten Lokalisierung des TFIID-Komplexes in der Nähe solcher Promotoren führen könnte, deren Nucleosomen acetyliert sind. Einige Proteine, die in transkriptionelle Regulation involviert sind, darunter hTAFII250, als eine Untereinheit des TFIID-Komplexes, aber

auch GCN5 und P/CAF und besitzen konservierte Motive sog. Bromodomänen, die eine hohe Affinität zu acetylierten Lysinen in den Histon-N-Termini vermitteln (Dhalluin et al., 1999; Matangkasombut et al., 2000; Winston und Allis; 1999).

Die Regulation der Genexpression auf transkriptioneller Ebene und Chromatin-Struktur/Funktion wurden lange als zwei unterschiedliche Prozesse betrachtet. Im Lichte neuester Untersuchungen zeigte sich, dass beide Prozesse eng miteinander verflochten sind. So wurden TAFs, die ursprünglich als Komponenten des TFIID-Komplexes identifiziert wurden, inzwischen auch in Proteinkomplexen mit HAT-Aktivität nachgewiesen. Der SAGA-Komplex setzt sich neben verschiedenen anderen Proteinen aus TAF90, TAF60, TAF17, TAF25 und TAF68 zusammen (Apone et al., 1998; Nataranja et al., 1998; Sanders et al., 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der TFIIIC-Komplex, der aus Extrakten humaner Zellen isoliert wurde. Er kann sowohl in basaler als auch aktivierter Transkription den TFIID-Komplex substituieren, enthält aber auch eine Untereinheit mit Acetyltransferase-Aktivität, die homolog zum yGCN5 Protein ist (Brand et al., 1999a und b).

1.2 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Transkriptionelle Aktivatoren der AP-1 Familie binden in Form von Homodimeren oder Heterodimeren an spezifische, palindromische DNA-Elemente. Sie wandeln von Phorbolster-Tumorpromotoren, transformierenden Onkogenen, Polypeptidhormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen und UV-Bestrahlung ausgehende Signale in Genexpression um.

AP-1 spielt in vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Dazu gehören Zellproliferation, -differenzierung und -transformation, aber auch der Schutz der Zelle gegen Stress (Angel und Karin, 1991; Hilberg und Wagner, 1992; Johnson et al, 1993; Suzuki et al., 1994; Brown et al., 1994; Wang et al., 1996; Bossy-Wetzel et al., 1997; van Dam, 1995, 1998).

Die Struktur der Proteine der AP-1 Familie kann generell in zwei Bereiche unterteilt werden: in die Transaktivierungsdomäne (TAD) und die bZip-Region (Landschulz et al., 1988; Bohmann et al., 1989). Die bZip-Region besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten: der basischen Region und dem Leucin-Zipper. Die basische Region, die sich aus 12 bis 14 basischen Aminosäuren zusammensetzt, ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich. Die Leucin-Zipper Region formt eine α -Helix, in der jede siebte Aminosäure ein Leucin ist. Dadurch liegen die hydrophoben Leucin-Moleküle auf einer Seite der Helix und bilden somit eine Interaktionsfläche, die die Dimerisierung der AP-1 Proteine erlaubt. Die Anordnung der geladenen Aminosäuren dieser Helix bestimmt die Stabilität der Dimere (Vogt und Bos, 1990, Gentz et al., 1989; Smeal et al., 1989; Cohen und Curran, 1990).

Die AP-1 Mitglieder können in *jun*-, *fos*-, und *atf*-Genfamilien unterteilt werden. Die Proteine der Jun-Familie, die aus c-Jun, JunB und JunD bestehen, können sowohl Heterodimere mit Mitgliedern der Fos- und ATF-Familien als auch Homodimere mit den Mitgliedern der eigenen Familie bilden (Kouzarides und Ziff, 1988; Nishizawa et al., 1989; Smeal et al., 1989; Zerial et al., 1989; Matsui et al., 1990; Ziff, 1990; Hai und Curran, 1991; Hsu et al., 1991; Dorsey et al., 1995), während die Mitglieder der Fos-Familie c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, nur Heterodimere bilden. Ähnlich wie die Jun-Proteine können auch Mitglieder der ATF-Familie (ATF2, ATF3/LRF1 und B-ATF) Homodimere bilden (als Übersicht siehe Vogt und Bos, 1990; Angel und Karin, 1991; Karin et al., 1997; Ziff, 1990).

AP-1-Komplexe binden an die Konsensus-Sequenz 5'-T^T/_GA^G/_CTCA-3', das sogenannte TRE ("TPA-responsive element"), (Angel et al., 1987a, b). Es ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die funktionelle TREs in ihren Promotorsequenzen aufweisen (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), Zellzyklusregulatoren (z.B. Cyclin D1; Albanese et al., 1999; Sabbah et al., 1999), Tumorsuppressorgene (p53, Schreiber et al., 1999) und Zelltyp-spezifische Genprodukte (z.B. Osteocalcin, Schüle et al., 1990a). Im Promotor des c-jun-Gens befinden sich ebenfalls TRE-ähnliche Konsensussequenzen. Sie besitzen ein zusätzliches Basenpaar im Zentrum (Jun1: TGACATCA und Jun2: TTACCTCA). An diese binden vor

allem c-Jun/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).

Die Spezifität, mit der die AP-1 Homo- und Heterodimere an DNA binden und auch ihre Funktion sind abhängig von der Dimer-Zusammensetzung (Hai und Curran, 1991). Es wurde gezeigt, dass c-Jun Mutanten, die selektiv entweder mit c-Fos oder ATF-2 dimerisieren verschiedene Prozesse der Zelltransformation in CEFs regulieren (van Dam et al., 1998).

1.2.1 Die Familie der Jun Proteine

Die Proteine der Jun-Familie, c-Jun, JunB und JunD nehmen unterschiedliche Funktionen in der Zelle wahr. Während c-Jun als positiver Regulator der Zellproliferation beschrieben wurde, regulieren JunD und JunB Proliferation negativ zu. In Zellen die durch Entzug von Wachstumsfaktoren in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert wurden, führt die Stimulation mit Mitogenen zu einer schnellen Induktion von c-jun (Angel et al. 1987; Bohmann et al., 1987; Lee et al., 1987). Die Mikroinjektionen von Antikörpern gegen c-Jun führen zu einer Arretierung von Zellen in der G₀-Phase (Kovary et al., 1991). Weiterhin zeigen jun^{-/-} Maus-Embryo-Fibroblasten ein verminderte Proliferation, die mit einem G₁-Arrest einhergeht (Schreiber et al., 1999). Alle diese Daten weisen auf eine positive Rolle von c-Jun in der Zellzyklusprogression. Hingegen führt die Überexpression von JunD in NIH 3T3 Fibroblasten zu verminderter Proliferation und einem erhöhten Prozentsatz an Zellen in G₀ (Pfarr et al., 1994). JunB unterscheidet sich von c-Jun in der bZip-Region durch den Austausch von nur wenigen Aminosäuren. Dies führt zu einer zehnfach schwächeren DNA-Bindung von JunB im Vergleich zu c-Jun, sowohl im JunB-Homodimer als auch im JunB/c-Jun-Heterodimer und damit zur Repression der c-Jun Aktivität (Deng und Karin, 1993). Neben seiner Funktion als Inhibitor von c-Jun, ist JunB auch in der Lage Gene zu aktivieren, die multiple TRE-Elemente in ihrem Promotor aufweisen. Die Überexpression von JunB stimuliert die Expression des Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitors p16 und hemmt dadurch Proliferation in NIH 3T3 Fibroblasten (Passegue und Wagner, 2000).

1.2.2 Die Transaktivierungsfunktion von c-Jun und v-Jun

Mit Hilfe von c-Jun Mutationsanalysen wurde eine N-terminale Region identifiziert, die die Transaktivierungsfunktion der Jun-Proteine vermittelt (Bohmann et al., 1989). Die Funktion der Jun-Transaktivierungsdomäne ist unabhängig von der bZip-Domäne, da artifizielle Fusionen aus der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins und heterologen DNA-Bindedomänen in der Lage sind Transkription zu stimulieren (Struhl et al., 1988). In der N-terminalen Transaktivierungsdomäne weisen die Mitglieder der Jun-Familie eine geringe Homologie auf. Alle besitzen jedoch 3 Regionen, die sich durch eine Anhäufung negativ geladener Aminosäuren auszeichnen (Bohmann et al., 1989; Struhl et al., 1988; Angel et al., 1989). Damit gehören die Jun-Proteine, wie auch VP16 und GCN4, zur Klasse der „acidic-blob“ oder „sauren“ Transaktivatoren (Sadowski et al., 1988; Webster et al., 1989; Oehler und Angel 1992; Vanzo et al., 1993).

In-vitro-Transkriptionsstudien legten dar, dass das Transaktivierungssignal des c-Jun Proteins durch eine Region, die zwischen Transaktivierungsregion II und III des c-Jun Proteins (δ -Domäne) liegt reprimiert wird. Hingegen kann das Transaktivierungspotential des c-Jun Proteins durch externe Stimuli wie 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 erhöht werden (Binetruy et al., 1991; 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, durch eine Kinaseklasse, die als JNKs (**J**un-**N**-terminale **K**inasen) oder auch als SAPKs ("**S**tress **A**ctivated **P**rotein **K**inases") bezeichnet werden und zur Familie der MAPK (**M**itogen **A**ctivated **K**inases) gehören (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991; Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Gupta et al., 1996; Franklin et al., 1992). Um c-Jun phosphorylieren zu können, müssen die JNKs an die δ -Domäne binden (Hibi et al., 1993; May et al., 1998; Adler et al., 1995). Die δ -Domäne besitzt somit nicht nur eine reprimierende Funktion, sie ist auch in die positive Regulation der c-Jun Aktivität involviert.

Es kommen verschiedene Mechanismen, die der Aktivierung von c-Jun durch Phosphorylierung zugrunde liegen können, in Frage. Zum einen könnte die Phosphorylierung von c-Jun zu einer verstärkten Bindung von bisher noch nicht identifizierten Koaktivatoren oder zum Verlust der Bindung eines Repressors führen. Zum

anderen wurde gezeigt, dass die δ -Domäne in cis als Ubiquitinierungs- und Degradationssignal wirkt. Die Phosphorylierung von c-Jun an Ser63/73 führt zu einer verminderten Ubiquitinierung und damit zur Stabilisierung des Proteins (Musti et al., 1997).

In v-Jun, dem aus Avian Sarcoma Virus 17 isolierten onkogenen c-Jun Gegenstück (Maki et al., 1987), ist die δ -Domäne deletiert. In *in-vitro* Transkriptionsstudien besitzt v-Jun ein höheres Transaktivierungspotential als c-Jun (Bohmann et al., 1989). Weiterhin entgeht v-Jun durch den Verlust der δ -Domäne der ubiquitinabhängigen Degradation (Treier et al., 1994). Jedoch verhindert die Deletion der δ -Domäne im v-Jun auch eine Phosphorylierung durch die JNK (May et al., 1998; Dai et al., 1995). v-Jun entkommt daher der positiven wie negativen Regulation, die in c-Jun durch die δ -Domäne vermittelt wird und stellt somit eine konstitutiv aktive Form von c-Jun dar (Bohmann et al., 1989). Im Vergleich zu c-Jun besitzt v-Jun in CEFs (Chicken Embryonic Fibroblasts) ein hohes Transformationspotential (Bos et al., 1990) und induziert als v-Jun/ATF-2 Dimer wachstumsfaktorunabhängige Zellproliferation (van Dam et al., 1998).

Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, zu denen auch die Jun Proteine gezählt werden, besitzen eine modulare Struktur. Sie setzen sich aus einer DNA-Bindedomäne und einer oder mehreren Transaktivierungsdomänen zusammen. Eine Besonderheit dieser Klasse von Transkriptionsfaktoren ist, dass ihre Aktivität durch Überexpression der Transaktivierungsdomäne gehemmt werden kann. Dieser Effekt wird als „Sqelching“ bezeichnet und beruht darauf, dass Faktoren, die mit der Transaktivierungsdomäne interagieren, austitriert werden (Gill und Ptashne, 1988; Sadowski et al., 1988; Tasset et al., 1990). „Sqelching“ Experimente lieferten Hinweise, dass auch die Transkriptionsfaktoren c-Jun und v-Jun mit titrierbaren Komponenten des RNA-Polymerase II Transkriptionskomplexes oder mit sogenannten Koaktivatoren interagieren (Angel et al., 1989). Weiterhin ließen diese Art der Experimente den Schluss zu, dass Transkriptionsfaktoren des sauren Typs einen oder mehrere gemeinsame Transaktivierungswege nutzen (Oehler und Angel, 1992). Da saure Transaktivierungsdomänen in *S.cerevisiae* und höheren Eukaryonten gleichermaßen aktiv sind, wurde weiterhin ein konservierten Mechanismus postuliert, über den sie wirken (Struhl et al., 1988). Bisher sind nur wenige Interaktionen zwischen der c-Jun oder v-Jun Transaktivierungsdomäne und Komponenten der Transkriptionsmaschinerie bekannt.

Nachgewiesen werden konnten Interaktionen zwischen c-Jun und TBP, einem Faktor der basalen Transkriptionsmaschinerie. Außerdem interagieren c-Jun und v-Jun mit CBP (**CREB Binding Protein**), einem Koaktivator mit Histon-Acetyltransferase Aktivität (Ransone et al., 1993; Arias et al., 1994; Chrivia et al., 1993). Die Interaktion von CBP mit c-Jun ist unabhängig vom c-Jun Phosphorylierungsstatus, jedoch sind die Serine an Position 63/73 im c-Jun Protein essentiell (Bannister et al., 1995). Als weiterer c-Jun kontaktierender Koaktivator-Komplex wurde p52/54 identifiziert. p52/54 interagiert spezifisch mit Transaktivatoren des „acidic-blob“ Typs (Oehler und Angel, 1992).

2. ZIELSETZUNG

Gegenwärtig ist nur unzureichend geklärt, über welche Mechanismen c-Jun oder v-Jun die Transkription RNA-Polymerase II abhängiger Gene stimulieren. *In-vivo*-Kompetitionsexperimente (Squelching) lieferten Hinweise, dass die Aktivität von c-Jun und v-Jun von Brückenproteinen (Koaktivatoren) abhängt, die auch von anderen Transkriptionsfaktoren mit saurer Transaktivierungsdomäne genutzt werden. Die Interaktion von c-Jun oder v-Jun mit CBP oder p52/54 erklären die transkriptionelle Aktivität der Jun Proteine nur zum Teil. CBP scheint ein relativ unspezifischer Koaktivator zu sein, da er mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren interagiert (zur Übersicht Shikama et al., 1997). CBP kontaktiert die zwei N-terminalen sauren Regionen (Region 1 und 2) der c-Jun Transaktivierungsdomäne (Bannister et al., 1995). p52/54 vermittelt zwar spezifisch die transkriptionelle Aktivierung durch saure Aktivatoren, allerdings interagiert dieser Komplex ausschließlich mit der ersten sauren Regionen der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins. Die Aktivität der dritten sauren Region wird durch p52/54 oder CBP nicht vermittelt (Oehler und Angel, 1992; Bannister et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit sollten daher weitere c-Jun und v-Jun spezifische Koaktivatoren identifiziert werden. Hierfür wurden verschiedene Lösungsansätze gewählt.

Im ersten Teil sollte überprüft werden, ob die Aktivität des c-Jun oder v-Jun Proteins von der Funktion des SAGA bzw. Ada-Komplexes abhängt. Hierfür sollten *S.cerevisiae* Stämmen verwendet werden, in denen ausgewählte Komponenten des Ada- oder SAGA-Komplexes durch homologe Rekombination deletiert sind. In diesen *S.cerevisiae* Mutanten ist die Aktivität der sauren Transkriptionsfaktoren VP16, GCN4 und Hap4 reduziert (Marcus et al., 1994).

Der zweite Teil beschreibt die Durchführung eines „two-hybrid screens“, mit dessen Hilfe versucht wurde Interaktionspartner zu finden, die spezifisch mit der Transaktivierungsdomäne des c-Jun oder v-Jun Proteins interagieren und für den Transaktivierungsprozess von Bedeutung sind.

Im dritten Teil der Arbeit wurden bisher bekannte Koaktivatoren auf ihre mögliche Funktion in der c-Jun abhängigen Transkription getestet. Das besondere Augenmerk lag dabei auf hTAFII55, das mit dem sauren Transaktivator YY1 interagiert und ein ähnliches Molekulargewicht (55kD) wie der beschriebene Koaktivatorkomplex p52/54 besitzt (Oehler und Angel, 1992).

3. MATERIAL

3.1 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
Casaminosäuren	Difco, Detroit
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
2',3'-Dideoxynucleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim

2'-Deoxynucleosid-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
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-Thiogalaktopyranosid	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
Nucleosid-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
Methylmethansulfonat (MMS)	Serva, Heidelberg
Glutathion (GSH)	Fluka, Buchs

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

3.2 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
	Hoefel 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

3.3 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.

3.4 Radiochemikalien

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

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

3.5 Antikörper

αhTAFII55 (Klon 19TA)

Monoklonal, IgG2b aus Maus; Irwin Davidson

αc-Jun

Monoklonal, IgG2b aus Maus, gerichtet gegen den N-Terminus von c-Jun; Transduction Laboratories

αS63-phospho-c-Jun

Polyklonal aus Kaninchen, gerichtet gegen c-Jun, welches an Ser63 phosphoryliert ist; New England Biolabs

αLexA

Polyklonal aus Kaninchen, gerichtet gegen die DNA-Bindedomäne des LexA Proteins; Santa Cruz

Sekundäre Antikörper:

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

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

3.6 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% Casaminoäuren; 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.

3.7 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

3.8 Bakterienstämme

E. coli DH5 α ; Genotyp: F-, Δ 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*

3.9 Hefestämme

EGY48	MAT α <i>his3</i> Δ 200 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> 6LexAop- <i>leu2</i>
FY 602	MAT α <i>his3</i> D200 <i>leu2</i> Δ 1 <i>lys2-128</i> δ <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> (Sternier et al., 1999)
FY 294	MAT α <i>spt3</i> Δ 202 <i>his4-917</i> δ <i>leu2</i> Δ 1 <i>lys2-173</i> R2 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> (Sternier et al., 1999)
PSY 316	MAT α <i>ade2-101</i> <i>his3</i> Δ 200 <i>leu2-3</i> ,2-112 <i>lys2</i> <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> (Candau et al., 1996)
PSY316 Δ ada2/ <i>gcn5</i>	MAT α <i>ada2</i> Δ 1 <i>gcn5</i> Δ 1 <i>ade2-101</i> <i>his3</i> Δ 200 <i>leu2-3</i> ,2-112 <i>lys2</i> <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> (Candau et al., 1996)

3.10 Zelllinien

F9-Zellen

Murine Teratokarzinomzelllinie

HEK 293

mit Adenovirus Serotyp5 E1A transformierte, menschliche, embryonale Nierenzellen, von D. Bohmann, EMBL, Heidelberg zur Verfügung gestellt

3.11 Oligonucleotide

PAG (sense, BamHI)

5`-cgc gga tcc cga tgt ctt cag gaa atg cta aaa ttg gg-3`

PAG (antisense, EcoRI)

5'-cgg aat tct act tct gct tgg aga aat att ctt tcc-3'

PAG C52S (sense)

5'-ttt gtg agc ccc acg gag atc att gc-3'

PAG C52S (antisense)

5'-cgt ggg gct cac aaa ggt gaa gtc tag agg gta-3'

TRE

5'-agc taa agt **ggt gac tca** tca cta t-3'

5'-agc tat agt **gat gag tca** cca ctt t-3'

mTRE

5'-agc taa agt **ggc gat cgt** tca cta t-3'

5'-agc tat agt **gaa cga tcg** cca cttt-3'

4. METHODEN

4.1 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).

4.1.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS (37°C) gewaschen, 1/10 des ursprünglichen Mediumvolumens Trypsin-Lösung zupipettiert und für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und durch Zentrifugation pelletiert. Nach Resuspendieren in frischem Kulturmedium wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung auf Zellkulturflaschen oder -schalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Nach 1 h 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 10 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300xg, 3 min) und auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

Einfriermedium: Kultivierungsmedium + 10% DMSO

4.2.3 Fällung von Nucleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Präzipitat wurde bei 13000xg, 10 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

4.3 DNA-Präparation

4.3.1 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 Lysozymlösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl alkalischer Lösung und Mischen wurden 100 µl 3 M Natriumazetat (pH 4,8) 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 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

Lysozymlösung: 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

4.3.2 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 auf Eis), 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, mit 70 % Ethanol gewaschen, das Präzipitat 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 4,8

4.4 Klonierungstechniken

4.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonucleasen

In einer wäßrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuclease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuclease 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.

4.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit 1 µl alkalischer Phosphatase (2 U/µl) in einem Endvolumen von 50 µl CIP-Puffer versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-überhängenden Enden durch 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde erneut 1 µl 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 µl Enzym nach den ersten 30 min).

In beiden Fällen wurden anschließend 42,5 μ l H₂O; 10 μ l TNE und 2,5 μ l SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA.

CIP-Puffer: 50 mM Tris pH 9,0; 1 mM MgCl₂; 0.1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin

1xTNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

4.4.3 Phosphorylierung von Oligonucleotiden und Linkern

Etwa 2 μ g Oligonucleotid- oder Linker-DNA wurden mit 1 μ l 10 mM ATP und 1 μ l T4-Polynucleotid-Kinase (10 U/ μ l) in einem Endvolumen von 10 μ 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 mM Tris pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 15 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,2 mg/ml BSA

4.4.4 Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2 μ l 10 mM DTT, 1 μ l 10 mM dNTP-Mix, 2 μ l 10 x Polymerasepuffer und 1 μ l *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ μ l) in einem Endvolumen von 20 μ l versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

dNTP-Mix: je 10 mM dATP; dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5

1xPolymerase-Puffer: 7 mM Tris pH 7,5; 7 mM MgCl₂; 50 mM NaCl

4.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 μ l 10 x Ligationpuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (2 U/ μ l) versetzt und in einem Endvolumen von 20 μ l 1 h bei RT inkubiert.

Bei glatten DNA-Enden wurde für die Reaktion 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

4.4.6 Herstellung chemo-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 OD₆₀₀=0,28 inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 100 ml PSI-Medium wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀=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%
Glyzerin

4.4.7 Transformation kompetenter Bakterien

50 µl kompetente Bakterien wurden mit Plamid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen gemischt 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

4.4.8 Herstellung elektro-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 OD₆₀₀=0,5 inkubiert. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A6.9, 5000 UpM, 10 min, 4°C) wurden diese drei Mal mit 10%igem Glycerol gewaschen. Danach wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Centrikon H-401, Rotor AS 4.13, 5000 UpM), in 5 ml eiskaltem 10%igem Glycerol 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.

4.5 DNA-Gelelektrophorese

4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5% 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

Laufpuffer (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

4.5.2 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 im UV-Durchlicht sichtbar gemachte die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen) das DNA-Fragment isoliert.

4.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 6-10% Polyacrylamidgele verwendet. Für ein 6% 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
Glyzerin-Puffer:	10 mM EDTA pH 8,0; 10% Glyzerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

4.5.4 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 1400 V durchgeführt bevor die Proben aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 1400 V. 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
--------	---

4.6 Sonstige DNA-Methoden

4.6.1 Southern-Blot

Vor dem Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Gene Screen-Membran wurde die DNA in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl zu Einzelstängen denaturiert. Danach wurde die DNA mittels Kapillarkräften, in 10x SSC, auf die Membran transferiert (Blot). Der

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

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

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonucleotiden (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

4.6.3 Sequenzierung von DNA

Gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des "T7-Sequenase-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-Oligonucleotid 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-Nucleosidtriphosphaten. 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

4.7 RNA-Methoden

4.7.1 Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 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 Gummi-schaber 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

4.8 Protein-Methoden

4.8.1 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)

4.8.2 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 zwischen zwei, durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Ethanol entfernt, die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Anschließend wurde das polymerisierte 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 30 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden

Glasplatten voneinander getrennt, das Gel 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

4.8.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

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 Vakuum getrocknet.

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

4.8.4 Immunoblot-Analyse von Proteinen ("Western-Blot")

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer Naßtransferzelle (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 TBT geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 3% fettfreier Milch in TBT (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min in TBT gewaschen und danach 1 h mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 3% fettfreier Milch in TBT (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBT wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (Amersham Buchler, Braunschweig) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde ein Röntgenfilm exponiert. Das Detektionssystem basiert auf der von Chemolumineszenz begleiteten Oxidation eines cyclischen Diacylhydrazides, die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol

TBT: 20 mM Tris-Base, 137 mM Natriumchlorid; 0,5% Tween 20;
pH 7,5

4.8.5 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

4.8.6 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 0,8 ml Ethylazetat. Das Chloramphenicol und seine azetylierten Produkte werden durch starkes Mischen extrahiert. 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.

4.8.7 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 fusioniert.

Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes BL21 pLysS wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei 25-37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression der Proteine durch 0,1 mM IPTG induziert. Nach 2-3 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3000xg, 10 min, 4°C) sedimentiert, und durch einmaliges Einfrieren/Auftauen lysiert. Die Bakterien wurden in 6 ml eiskaltem IP-100 (+) resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die bakterielle DNA wurde mechanisch im Ultraschall auf Eis geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10000xg; 15 min; 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in IP-100 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 vier Mal mit dem zehnfachen Volumen IP-100 gewaschen, wobei der letzte Waschschrift

unter 15 minütiger Rotation durchgeführt wurde. Die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Agarose wurde entweder direkt aliquotiert und bei -80°C eingefroren, oder es wurde eine Elution mit 5 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) durchgeführt. So gereinigtes Fusionsprotein wurde gegen eiskaltes PBS (+10% Glycerin) dialysiert und bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 l mit H₂O

IP-100: 25 mM Tris pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 10 % Glycerol; 0,1 % NP-40; 2 mM DTT; 1 mM PMSF

IP-100 (+): IP-100; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Pepstatin; 10 µg/ml Aprotinin

4.8.8 GST-pulldown-Assay

Die gewünschte Menge GST-Fusionsprotein wurde in IP-100 30 min unter Rotieren an 40 µl Glutathion-Agarose gebunden, welche zuvor in IP-100 gequollen und äquilibriert wurde. Um überschüssiges Fusionsprotein zu entfernen wurde drei Mal mit je 500 µl IP-100 gewaschen, der Überstand verworfen, die auf Interaktion zu testenden Proteine hinzugefügt, mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt und die Reaktion 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl IP-100 zugefügt und bei 4°C unter Rotieren die Inkubation fortgesetzt. Unspezifisch interagierende Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit je 500 µl IP-100 entfernt, wobei der letzte Schritt unter 15 minütigem Rotieren erfolgte. Anschließend wurden 40 µl Protein-Auftragspuffer zugesetzt, die Proben 10 min aufgekocht und auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt.

IP-100: 25 mM Tris pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 10 % Glycerol; 0,1 % NP-40; 2 mM DTT; 1 mM PMSF

4.8.9 Herstellen der Na_3VO_4 -Stocklösung (Kypta 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 stabil bei 10,0 war. Anschließend wurde das Endvolumen eingestellt und die Stammlösung für maximal 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

4.8.10 Präparieren von Gesamtzellextrakten

Die Zellen wurden zunächst einmal mit 5 ml eiskaltem PBS(+) gewaschen, in 1ml PBS(+) von der Platte geschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 5 min bei 3000 rpm und 4°C sedimentiert und nach Entfernen des Überstandes in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 15 minütiger Rotation bei 4°C wurden die Proben 10 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei Bedarf bei -80°C eingefroren.

PBS(+):	PBS, 1mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF
Lysispuffer:	25 mM Tris pH 7,8; 5 mM MgCl_2 ; 100 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 % NP-40; 0,25 % NaDesoxycholat; 1 mM PMSF; 10 µg/µl Aprotinin; 10µg/µl Leupeptin; 10 µg/µl Pepstatin; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM NaF

4.8.11 *in-vitro*-Translation im TNT-System (Promega)

Die *in-vitro*-Translation im TNT-System wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Translationsprodukt wurde bei -80°C gelagert.

4.9 Hefetechniken

4.9.1 Kultivieren der Hefen

Das Kultivieren der Hefen erfolgte in YPD-Vollmedium oder bei Bedarf in d/o-Minimalmedium. Die Medien wurden durch Mischen von je 200 ml sterilem H₂O bidest, 20 ml steril filtrierter 40 % iger Glukose und 200 ml 2xYEP für YPD Medium, bzw. 2xd/o für d/o-Minimalmedium hergestellt. Bei Bedarf wurde zum Minimalmedium noch 4 ml der gewünschten steril filtrierten 1%igen Aminosäurelösung hinzugefügt.

2xYPD:	4 % Bacto Peptone, 2 % Yeast Extract, autoklaviert
2xd/o:	1,34 % Yeast nitrogen base (YNB), 0,4 % drop out powder, steril filtriert
drop out powder:	2,5 g Adenin; 1,2 g L-Arginin; 6 g L-Asparaginsäure; 6 g L-Glutaminsäure; 1,8 g L-Lysin; 1,2 g L-Methionin; 3,0 g L-Phenylalanin; 22,5 g L-Serin; 12 g Threonin; 1,8 g L-Tyrosin; 9,0 g L-Valin

Uracil, L-Leucin, L-Tryptophan und L-Histidin wurden als 1%ige Lösungen eingesetzt.

4.9.2 Transformation von Plasmid DNA

50 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden zentrifugiert und das Pellet in 500 µl 100 mM Liziumazetat/10 mM TE pH 7,0 resuspendiert. 5 µl Lachs-Spermien-DNA (10 mg/ml), maximal 10 µl der gewünschten Plasmide, 50 µl der Hefesuspension und 300 µl 40% PEG wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben, durch Invertieren gut gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl DMSO zugefügt, wiederum gemischt und bei 42° C für 10 min inkubiert. Nach Waschen mit 200 µl TE pH 7,0 wurden die Hefen auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.9.3 Präparation von Plasmid-DNA

1 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurde zentrifugiert und das Pellet mit 1ml SCE-Lösung gewaschen. Alternativ wurde eine große Hefekolonie mit Hilfe eines Zahnstochers abgeschabt. Um Spheroblasten zu erzeugen wurden die Hefezellen in 200 µl Lösung I resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden 400 µl Lösung II hinzugeben, sofort ca. 5 x invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 300 µl Lösung III wurde sofort gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde zum Überstand 550 µl Isopropanol hinzugeben um die DNA zu fällen. Nach 10 min Inkubation bei -80°C wurde 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 20 µl Wasser gelöst.

SCE-Lösung: 182 g Sorbitol
 29,4 g Natriumcitrat
 22,3 g EDTA
 mit Wasser auf 1 l auffüllen

Lösung I: 10 ml SCE-Lösung
 10 µl β-mercaptoethanol (100%)
 5 mg Zymolase (Lyticase ...)

Lösung II: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Lösung III: 3 M Natriumazetat pH 4,8

4.9.4 Präparation genomischer DNA

5 ml YPD Medium wurde mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C bis zur stationären Phase unter Schütteln inkubiert. Die Hefen wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert, mit 0,5 ml Wasser gewaschen und in 200 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasskügelchen und 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) wurde 3 min bei voller Geschwindigkeit „gevortext“, so dass ein Grossteil der Hefen aufgeschlossen waren. Anschließend wurden

100 µl TE hinzugefügt und kurz durchgemischt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die wässrige Phase abgetrennt und anschliessend in ein neues Gefäß überführt. Die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol führte zur Fällung der DNA. Diese wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm; 10 min) pelletiert, der Überstand wurde abgenommen, die DNA getrocknet und in 400 µl TE gelöst und mit 30 µg RNase A versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl 4 M Ammoniumacetatlösung und 1 ml 100% Ethanol gefällt. Die pelletierte und getrocknete DNA wurde in 100 µl TE gelöst.

4.9.5 Bestimmen der β -Galaktosidase-Aktivität

- *ONPG-Test aus Flüssigkultur*

Eine Hefe-Übernachtskultur wurde auf eine OD_{600} von 0,05 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 30°C wachsen gelassen. 1 ml dieser Kultur wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und die Hefen durch 5 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm sedimentiert. Die Hefen wurden in 100 l Natriumphosphatpuffer resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl Chloroform 5 sec. lang durch vortexen aufgeschlossen. Anschliessend wurden 650 µl Reaktionslösung hinzugefügt und gut gemischt. Die Reaktion wurde bei 30°C für 1 bis 20 min inkubiert. Die Zugabe von 400 µl 1M Na_2CO_3 stoppte die Reaktion. Unlösliche Bestandteile wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 15.000 rpm sedimentiert und den Überstand in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Um die relative β -Galaktosidase-Aktivität zu ermitteln wurde zunächst die OD_{405} von 300 µl des Überstandes, anschliessend die OD_{600} von 300µl der Hefekultur, mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen. Die relative β -Galaktosidase-Aktivität berechnet sich aus der Formel: $A_{405} / (OD_{600} * t[h])$.

Natriumphosphatpuffer: 0,1 M Natriumphosphat pH 7,5 (Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 wurden im Verhältnis 82:18 gemischt)

ONPG-Lösung: 8 mg/ml ONPG gelöst in Natriumphosphatpuffer

100x Mg: 0,1 M $MgCl_2$; 4,5 M β -Mercaptoethanol

Reaktionslösung: frisch anzusetzen aus 17 ml Natriumphosphatpuffer; 0,2 ml 100 x Mg; 4 μ l 20%iges SDS; 2,3 ml ONPG-Lösung

- *X-Gal-Test auf Platte*

Hefekolonien wurden mittels Stempeltechnik auf eine X-Gal-Platte gebracht und bei 30°C ein bis zwei Tage wachsen gelassen.

X-Gal-Platte: 300 ml 3%igen Agar; 300 ml 2xd/o; 50 ml 10x Lösung I; 30 ml 40% Glukose; 3 ml X-Gal-Lösung

X-Gal-Lösung: 20 mg/ml X-Gal in Formamid gelöst

10x Lösung I: 68 g KH₂PO₄; 10 g NH₄SO₄; 21 g KOH; ad 1l mit H₂O bidest

4.9.6 Durchführung eines „Two-hybrid screens“

Der „Two-hybrid screen“ wurde nach Gyuris et al. 1993 durchgeführt. Dazu wurde die v-Jun Transaktivierungsdomäne 2 (v-Jun TAD2) an die heterologe LexA-DNA-Bindedomäne fusioniert. Dieses Fusionsprotein diente als „bait“. Eine HeLa cDNA-Bank, welche an das für die B42-Transaktivierungsdomäne kodierende Gen fusioniert wurde und Galaktose-abhängig exprimiert werden konnte, diente als „target“. Zunächst wurde das „bait“-Plasmid zusammen mit einem Lex-A abhängigen *lacZ*-Reporter-Gen in den Hefestamm EGY48 transformiert (Gietz et al. 1992). Dieser trägt, in das Genom integriert, ein weiteres LexA-abhängiges Reporter gen, welches für Leu2 kodiert. Der Stamm EGY48 ist auxotroph für verschiedene Marker. Dies erlaubt eine Selektion auf das „bait“-Plasmid (HIS3), das *lacZ*-Reporterplasmid (URA3) und das „target“-Plasmid (TRP1).

Anschliessend wurde das „target“-Plasmid transformiert (Gietz et al. 1992). Es wurden 10 Millionen primäre Hefe-Kolonien amplifiziert und auf Wachstum auf Leucin-freiem Medium, sowie auf β -Galaktosidase-Aktivität getestet. 500 Klone zeigten Galaktose-abhängige Reporteraktivität. Zunächst wurde die DNA aus 25 dieser Klone präpariert und

die „target“-Plasmide mit Hilfe des E. coli Stammes KC8 isoliert. Diese wurden zusammen mit verschiedenen LexA-Fusionen in den Hefestamm EGY48 retransformiert um so eine unspezifische Interaktion mit dem „bait“-Protein auszuschließen. Konnte eine unspezifische Interaktion ausgeschlossen werden, wurden die Klone sequenziert. Die Plasmide der restlichen 475 Hefe-Klone wurden isoliert, auf eine Membran transferiert und mit radioaktiv markierter DNA aus bereits sequenzierten „target“-Genen hybridisiert. Negative Klone wurden wiederum sequenziert und auf Spezifität getestet.

5. ERGEBNISSE

5.1 Die Rolle des SAGA Komplexes in der transkriptionellen Aktivierung durch v-Jun

5.1.1 Die Aktivität des v-Jun Proteins ist in *S.cerevisiae* unabhängig vom SAGA-Komplex

Der SAGA-Komplex, aktiviert Transkription auf zwei verschiedenen Wegen. Zum einen über Histonacetylierung. Dies ist eine Eigenschaft, die auch für den Ada-Komplex beschrieben wurde und von der katalytischen Untereinheit GCN5 und dem Adaptorprotein Ada2 abhängt. Zum anderen über die direkte Interaktion mit TBP; hierfür ist das Spt3 Protein essentiell (Eisenmann et al., 1992; Eisenmann et al., 1994; Roberts und Winston, 1997; Madison et al., 1997; Abb. 1). SAGA kann über saure Transkriptionsfaktoren an Promotoren rekrutiert werden, um dort Transkription zu stimulieren (Roberts et al., 1997; Ikeda et al., 1999; Vignali et al., 2000)

v-Jun und c-Jun sind in *S.cerevisiae* transkriptionell aktiv. Die Aktivität der v-Jun Transaktivierungsdomäne ist jedoch im Vergleich zur c-Jun Transaktivierungsdomäne phosphorylierungsunabhängig (Struhl, 1988; Kilbey et al., 1996). Daher wurde für die nachfolgenden Studien das v-Jun Protein gewählt. Um die Rolle des SAGA-Komplexes in der v-Jun vermittelten Transkription zu ermitteln wurden seine zwei Funktionen, Histon-Acetylierung und TBP-Kontakt, getrennt untersucht.

Die Bedeutung der Histon-Acetylierung wurde bestimmt, indem die Aktivität des Fusionsproteins aus LexA DNA-Bindedomäne (DBD) und v-Jun Transaktivierungsdomäne (LexA v-Jun) im *S.cerevisiae* Stamm PSY316 Δ ada2/ Δ gcn5 geprüft wurde. In diesem Hefestamm sind die Gene *ada2* und *gcn5* durch homologe Rekombination inaktiviert (Berger et al., 1992).

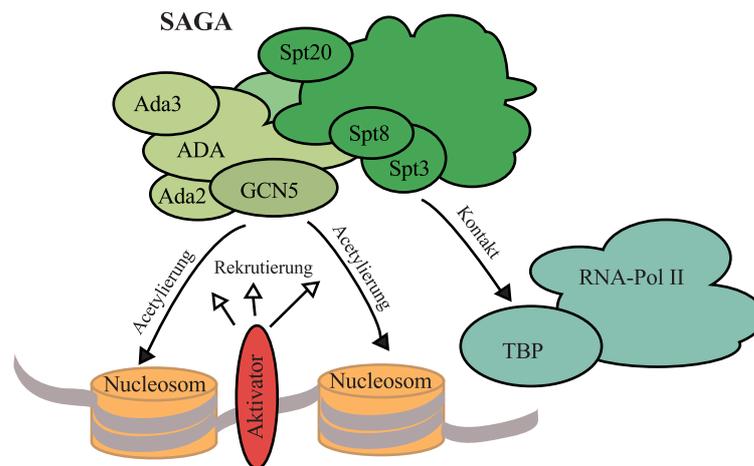


Abb.1 Modell der SAGA Struktur und Funktion.

Der SAGA Komplex wird durch Interaktion mit Aktivatorproteinen zum Promotor rekrutiert und acetyliert Nucleosomen. Gleichzeitig kontaktiert er aber auch TBP und rekrutiert dadurch den RNA-Polymerase II Transkriptionskomplex zum Promotor (Grant et al., 1998).

Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der Fusionsproteine aus LexA DBD und VP16- bzw. GCN4-Transaktivierungsdomänen (LexA Vp16 bzw. LexA GCN4) mit Hilfe eines LexA abhängigen *lacZ*-Reportergens gemessen. Wie erwartet zeigt sich die Aktivität des LexA VP16 Proteins in *ada2/gcn5*-Abwesenheit deutlich (um ca. 90%) verringert (Marcus et al., 1994). Auch die Aktivität des GCN4 Proteins ist drastisch (um ca. 90%) reduziert, wenn *ada2* und *gcn5* deletiert wurden (Abb. 2A). Hingegen aktiviert LexA v-Jun die Transkription im Hefestamm $\Delta ada2/\Delta gcn5$ mit gleicher Effizienz wie im wildtyp-Stamm PSY316. Demzufolge ist die Aktivität des v-Jun Proteins in *S.cerevisiae* unabhängig von der Histonacetyltransferasefunktion der SAGA- und Ada-Komplexe.

Neben der Acetylierungsfunktion könnte der SAGA-Komplex jedoch auch als Brückenprotein zwischen v-Jun und TBP wirken. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der v-Jun Transaktivierungsdomäne in *S.cerevisiae* Mutanten getestet, deren *spt3*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde (FY296, im folgenden als $\Delta spt3$ bezeichnet), (Madison et al., 1997; Sterner et al., 1999). Bei Koexpression des LexA v-Jun Proteins ist der LexA abhängige *lacZ*-Reporter

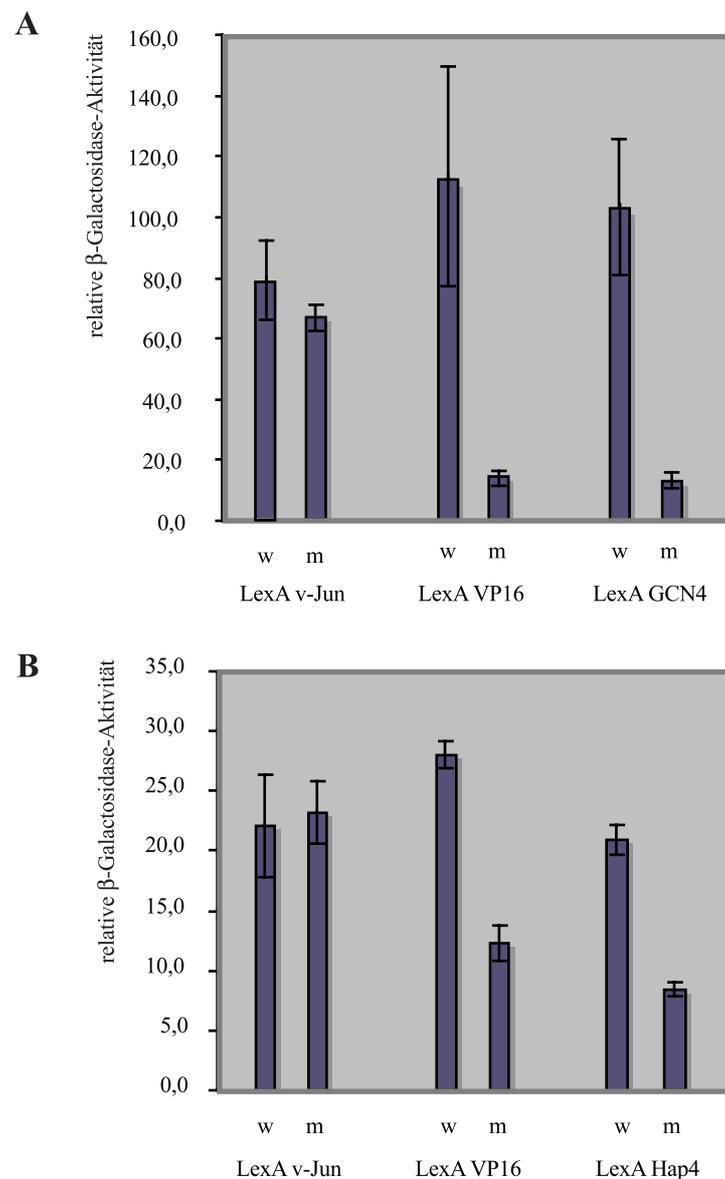


Abb. 2 Grafische Darstellung der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren in *S.cerevisiae* Stämmen mit mutantern SAGA-Komplex.

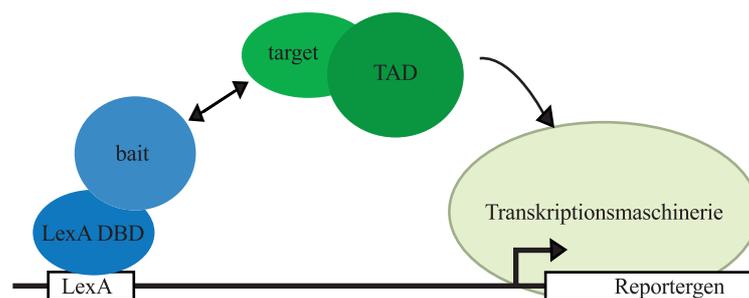
A. Die Expressionsvektoren pRS316 LexA v-Jun, pRS316 LexA VP16 und pRS316 LexA GCN4 wurden jeweils mit einem LexA-abhängigen *lacZ*-Reporterkonstrukt in den *S.cerevisiae* Stamm Δ ada2/ Δ gcn5 oder den wildtyp Stamm PSY316 transformiert und die Aktivität der LexA Fusionsproteine mittels ONPG-Test bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. **B.** Die Stämme FY294 (Δ spt3) und FY963 (wt) wurden mit einem LexA-abhängigen Reporterkonstrukt und den Expressionsvektoren pRS316 LexA v-Jun, pRS316 LexA VP16 und pRS316 LexA Hap4 transformiert. Die Aktivität der LexA Fusionsproteine wurde im ONPG-Test ermittelt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten wurden dargestellt.

im wildtyp (FY602), sowie im Δ spt3-Stamm vergleichbar aktiv (Abb. 2B). Im Gegensatz dazu kann die VP16 Transaktivierungsdomäne die Transkription nicht mehr effizient stimulieren (um ca. 55% reduziert), wenn die Spt3 Untereinheit deletiert wurde. Auch das Fusionsprotein aus der LexA DNA-Bindedomäne und der sauren Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Hap4 (LexA Hap4) verliert in der Δ spt3 Mutante ca. 60% der Aktivität (Abb. 2B). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Aktivität des v-Jun Proteins auf einem Mechanismus beruht, der unabhängig von SAGA ist.

5.2 Isolation von Interaktionspartnern der v-Jun Transaktivierungsdomäne im „two-hybrid screen“

5.2.1 Bestimmung der Aktivität der einzelnen v-Jun Transaktivierungsdomänen in *S.cerevisiae*

Mit den verwendeten $\Delta ada2/gcn5$ - und $\Delta spt3$ -*S.cerevisiae* Stämmen war eine Identifizierung von Faktoren, die zur Transaktivierung durch c-Jun beitragen, nicht möglich. Um Proteine zu isolieren, die spezifisch mit der c- und v-Jun Transaktivierungsdomäne interagieren, sollte daher ein klassischer „two-hybrid screen“ durchgeführt werden.



Reportergene	Selektion
<i>leu2</i>	Wachstum auf Leucin-freiem Medium
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Aktivität

Abb. 3 „Two-hybrid screen“.

Das „bait-Protein in blau dargestellt, bindet an die LexA-Erkennungssequenz im Promotor eines Reportergens. Es interagiert mit dem „target“-Protein, welches in grün dargestellt ist. Dieses aktiviert mit Hilfe seiner Transaktivierungsdomäne die Transkription des Reportergens.

Der „two-hybrid screen“ ist eine effiziente Methode für die Suche nach Interaktionspartnern (Yang et al., 1992; Zervos et al., 1993; Staudinger 1993). Das „bait“-Protein (Köder-Protein) ist in einem klassischen „two-hybrid screen“ nach Gyuris et al.

(1993) eine Fusion aus der DNA-Bindedomäne des prokaryotischen LexA-Proteins und der Proteindomäne, für die ein Interaktionspartner gesucht werden soll. Die potentiellen Interaktionspartner werden von einer cDNA-Bank kodiert, die artifiziell an eine weitere cDNA fusioniert wurde, welche für eine Transaktivierungsdomäne kodiert („target“- oder Ziel-Protein). Interagieren „bait“ und „target“-Proteine miteinander, so bilden sie einen Komplex, der spezifisch an LexA-Erkennungssequenzen bindet und die Transkription aktiviert. Interaktionen zwischen dem „bait“- und dem „target“-Protein werden durch die Aktivität eines LexA-abhängigen Reportergens angezeigt (Abb. 3). Der „two-hybrid screen“ wird in dem *S.cerevisiae* Stamm EGY48 durchgeführt (Gietz et al. 1992). Dieser trägt, in das Genom integriert, ein LexA-abhängiges Reportergen, welches für *leu2* kodiert. Der Stamm EGY48 ist auxotroph für verschiedene Marker. Dies erlaubt eine Selektion auf das „bait“-Plasmid (*his3*), das „target“-Plasmid (*trp1*) und ein weiteres LexA abhängiges Reporterplasmid (*ura3*).

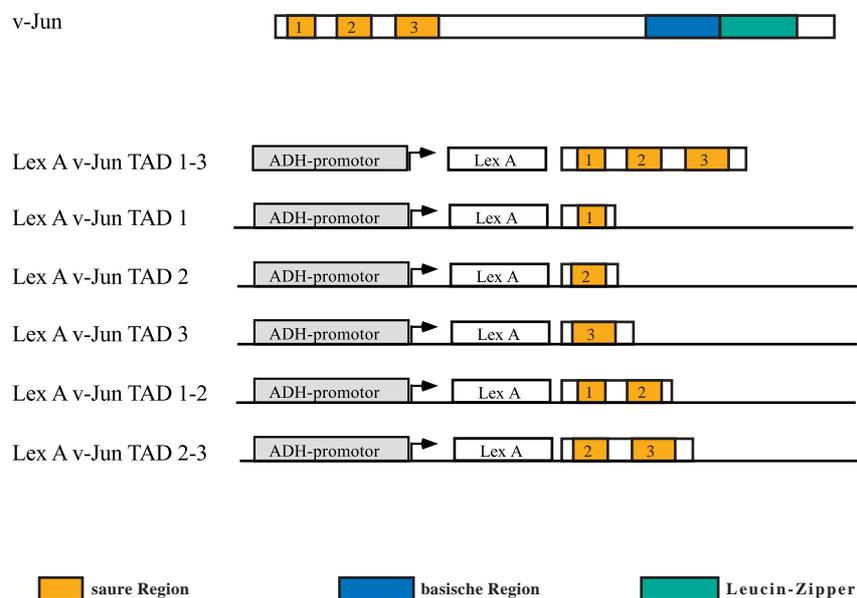


Abb. 4 Schematische Darstellung der LexA v-Jun Fusionsproteine.

Die Expression der LexA v-Jun Fusionsproteine erfolgt unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven ADH-Promotors (pEG202). Die sauren Regionen der v-Jun Transaktivierungsdomäne sind in gelb dargestellt. Region 1 umfasst Aminosäuren 6-22, Region 2 Aminosäuren 31-49 und Region 3 Aminosäuren 74-99 des v-Jun Proteins. Zum Vergleich ist das v-Jun Protein selbst dargestellt.

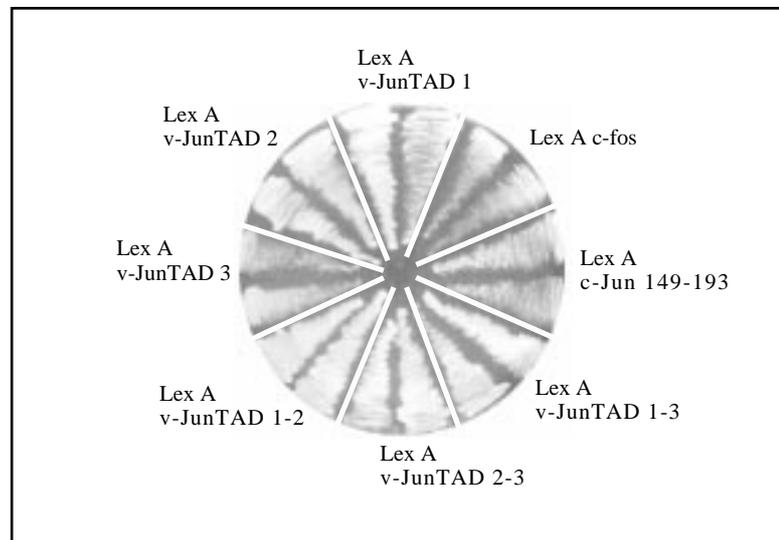
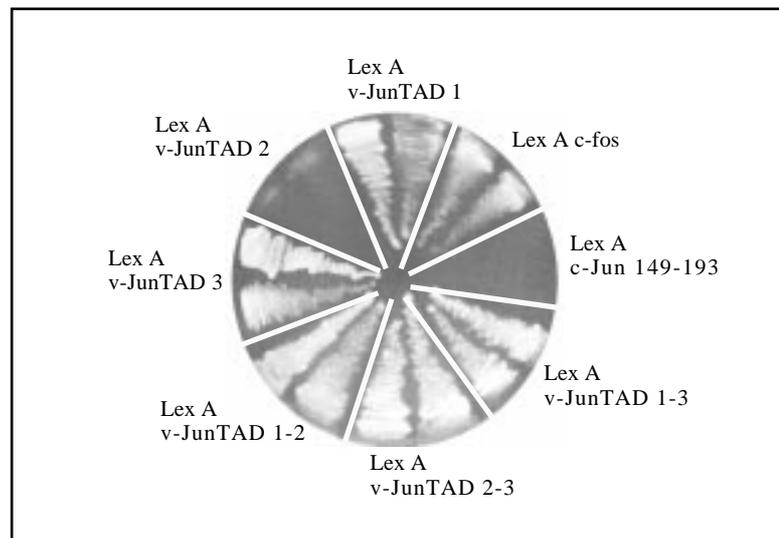
A Minimalmedium +Leu**B Minimalmedium -Leu**

Abb. 5 Test der Aktivität der LexA v-Jun Fusionskonstrukte mit Hilfe des *leu2*-Reportergens.

A. Die jeweils angegebenen LexA Fusionskonstrukte wurden zusammen mit dem LexA-abhängigen *leu2*-Reportergen in den *S.cerevisiae* Stamm EGY48 transformiert und die daraus resultierenden Kolonien wurden auf Wachstum auf Leucin-haltigem Medium getestet. B. Parallel dazu wurden die selben Kolonien auf Medium gestrichen, welches kein Leucin enthält. Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

c-Jun und sein onkogenes Gegenstück v-Jun sind nicht nur in höheren Eukaryonten sondern auch in *S.cerevisiae* transkriptionell sehr aktiv (siehe Abb. 2; Struhl, 1988). Fusionen aus der LexA-DBD und der Transaktivierungsdomäne der c- oder v-Jun Proteine würden daher schon alleine, d.h. in der Abwesenheit von „target“-Proteinen LexA-abhängige Reportergene aktivieren. Sie eignen sich folglich nicht uneingeschränkt als „bait“-Proteine. Es sollten deshalb LexA Fusionen aus Deletionsmutanten der v-Jun Transaktivierungsdomäne hergestellt werden, deren Aktivität gering genug ist, um sie im two-hybrid screen als bait-Proteine verwenden zu können. Um das Transaktivierungspotential der einzelnen v-Jun Regionen in *S.cerevisiae* zu bestimmen wurden verschiedene, für die Transaktivierungsdomäne kodierende Bereiche des v-Jun Gens mit einer cDNA fusioniert, die für die heterologe DNA-Bindedomäne des LexA-Proteins kodiert (Abb. 4).

Die LexA v-Jun Fusionsgene wurden im *S.cerevisiae* Stamm EGY48 exprimiert und das Transaktivierungspotential der Fusionsproteine mit Hilfe eines LexA-abhängigen *leu2*-Reportergens bestimmt. Um eine Toxizität der exprimierten LexA Fusionsproteine auszuschließen, wurden die verwendeten Kolonien zunächst auf Leucin-haltigem

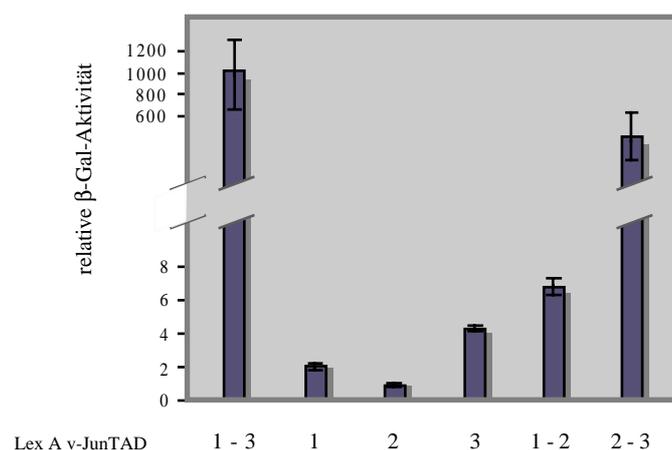


Abb. 6 Test der Aktivität der LexA Fusionsproteine mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens.

Die angegebenen LexA v-Jun Fusionskonstrukte wurden zusammen mit einem LexA-abhängigen *lacZ*-Reportergenkonstrukt in den *S.cerevisiae* Stamm EGY48 transformiert und die Aktivität der LexA Fusionsproteine im ONPG-Test bestimmt. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Minimalmedium ausgestrichen (Abb. 5A). Auf Medium, welches Leucin enthält, zeigt die Expression der LexA v-Jun Proteine keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der getesteten Hefekolonien. Die Aktivität des *leu2*-Reportergens, die sich im Wachstum auf Leucin-freiem Minimalmedium widerspiegelt, wurde durch Ausstreichen der Kolonien auf diesem Medium bestimmt (Abb. 5B). Bis auf LexA v-JunTAD2 (Fusion aus LexA DBD und Region 2 der v-Jun Transaktivierungsdomäne), ist die Transaktivierung durch die Fusionsproteine hoch genug um Wachstum auf Leucin-freiem Minimalmedium zu vermitteln (Abb. 5B). Als Positivkontrolle wurden Hefekolonien, die das LexA c-Fos Protein exprimieren parallel ausgestrichen. c-Fos ist, wenn es artifiziell an die LexA DBD fusioniert wurde in *S.cerevisiae* sehr aktiv. Hingegen besitzt die Fusion aus LexA c-Jun146-193 keine eigene Aktivität und zeigt daher auch kein Wachstum auf Leucin-freiem Medium.

Um neben der qualitativen Aussage auch eine quantitative Aussage treffen zu können wurde die Aktivität des LexA-abhängigen *lacZ*- Reportergens nach Expression der verschiedenen LexA v-JunTAD Fusionsproteine gemessen. Das *lacZ*-Reportergen kodiert für die β -Galaktosidase. Die Aktivität des *lacZ*-Reportergens und damit der LexA Fusionsproteine

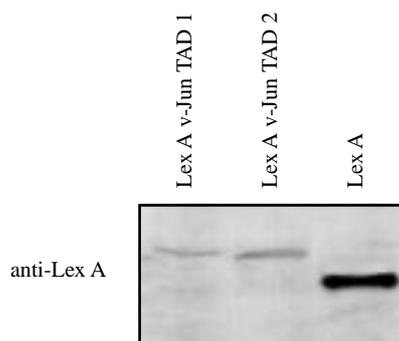


Abb. 7 Bestimmung der Mengen an LexA-Fusionsprotein.

Die Fusionskonstrukte LexA v-JunTAD1, LexA v-JunTAD2 und LexA selbst wurden in den *S.cerevisiae* Stamm EGY48 transformiert, Proteinextrakte präpariert und die LexA Proteine in der Westernblot-Analyse mit Hilfe eines LexA-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Proteinkonzentrationen in den Proteinextrakten wurden mit Hilfe des Lowry-Tests bestimmt. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen und der Auftrag durch Ponceau-Färbung nachgeprüft.

wurde deshalb über die Effizienz gemessen, mit der die β -Galaktosidase das Substrat *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranoside (ONPG) umsetzt. Vergleicht man die Aktivität der einzelnen Regionen der v-Jun Transaktivierungsdomäne (Abb. 6), so besitzt die v-Jun TAD3 (v-Jun Transaktivierungsdomäne, Region 3) die höchste transkriptionelle Aktivität, v-Jun TAD2 die niedrigste. Die durch LexA v-Jun TAD1-2 (v-Jun Transaktivierungsdomäne, Region 1-2) vermittelte Aktivität entspricht etwa der Summe der v-Jun TAD1- und TAD2- Aktivitäten. Im Gegensatz zu v-Jun TAD1 und TAD2, deren Aktivierungspotentiale additiv sind, ist die Aktivität von v-Jun TAD2-3 (v-Jun Transaktivierungsdomäne, Region 2-3) um ein hundertfaches höher als die Summe der TAD2-, TAD3-Einzelaktivitäten. v-Jun TAD1 und TAD2 wirken somit synergistisch.

Um auszuschließen, dass die schwache transkriptionellen Aktivität des LexA v-JunTAD2 Proteins nicht auf eine ineffiziente Transkriptions- oder Translationsrate des Konstruktes oder eine geringe Halbwertszeit des Proteins und damit auf verminderte Proteinmengen zurückzuführen ist, wurden die LexA Fusionsproteine mit Hilfe eines LexA spezifischen Antikörpers in Extrakten aus LexA, LexA TAD1 und LexA TAD2 exprimierenden *S.cerevisiae* Kulturen nachgewiesen (Abb. 7). LexA v-JunTAD2 liegt in wesentlich geringeren Mengen vor als die LexA DNA-Bindedomäne alleine. Die Proteinmenge ist jedoch vergleichbar mit der von LexA v-JunTAD1, dessen Aktivität ausreichend ist um Wachstum auf Leucin-freiem Minimalmedium zu erlauben.

5.2.2 Isolation von PAG als Interaktionspartner von v-Jun in einem two-hybrid screen

Die schwache Aktivität des LexA v-Jun TAD2 Proteins erlaubte es, dieses als „bait“ in einem klassischen „two-hybrid screen“ (Chien et. al., 1991; Gyuris et al., 1993) einzusetzen um so mögliche v-Jun Interaktionspartner zu isolieren. Es wurde der *S.cerevisiae* Stamm EGY48 verwendet. Zunächst wurden das für LexA v-JunTAD2 kodierende Expressionsplasmid zusammen mit einem LexA-abhängigen *lacZ*-Reportergen in den Hefestamm EGY48 transformiert (Abb. 8A). Zusätzlich wurde in einem zweiten Schritt eine galaktoseinduzierbare, an die Transaktivierungsdomäne des prokaryotischen Transkriptionsfaktors B42 fusionierte HeLa c-DNA Bank transformiert (Stratagene). LexA v-JunTAD2 wird sowohl auf Glukose-haltigem als auch auf Galaktose-haltigem Medium

exprimiert. Unter Galaktose-Bedingungen wird zusätzlich noch das B42-Fusionprotein der HeLa cDNA-Bank exprimiert. Eine Interaktion zwischen dem B42-Fusionsprotein und LexA v-JunTAD2 wird durch erhöhte Reporteraktivität auf Galaktose-haltigem, jedoch nicht auf Glukose-haltigem Medium angezeigt.

Zunächst wurden 3.000.000 primäre Transformanten einer Selektion auf Leucin-freiem, Galaktose-haltigem Minimalmedium unterzogen. Die Anzahl der primären Transformanten wurde durch Ausstreichen eines Teils des Transformationsansatzes auf Leucin-haltigem Medium bestimmt. Die aus der ersten Selektion resultierenden 20.000 Kolonien wurden auf Galaktose-abhängige β -Galaktosidaseaktivität getestet. Dies geschah durch Ausstreichen der Kolonien auf Leucin-freiem, Galaktose- und X-Gal-haltigem Medium. Der Umsatz des Substrates X-Gal durch die β -Galaktosidase lässt sich durch Blaufärbung der Kolonien erkennen. Von den ca. 500 Klonen, die auf Galactose-haltigem Leucin-freiem Medium wuchsen und Blaufärbung zeigten, wurde ein Teil sequenziert. Die cDNAs der so identifizierten Klone wurden radioaktiv markiert und als Proben in Southern blot-Analysen eingesetzt um die restlichen Klone zu gruppieren. cDNAs aus Klonen, die kein Signal gaben wurden wiederum sequenziert. Weiterhin wurden die c-DNA-tragenden Plasmide aus den bereits identifizierten Klonen isoliert, diese in den LexA v-JunTAD2 exprimierenden Hefestamm EGY48 transformiert und die daraus resultierenden Klone auf Galaktose-abhängige *lacZ*- und *leu2*-Reportergenaktivität getestet. Dies geschah um solche Klone auszusortieren, die aufgrund einer Veränderung der Wirtshefezelle falsch positive Signale zeigten. 128 der positiven Klone kodierte für PAG oder NKEF-A (proliferation associated gene oder natural killer cell enhancing factor-A), 97 für NKEF-B (natural killer cell enhancing factor-B). Die restlichen 238 Klone kodierten für Proteine, die typischerweise unspezifisch mit den unterschiedlichsten „baits“ interagieren (<http://www.fccc.edu:80/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork/html>). Dazu zählen HSPs (heat shock proteins) und ribosomale Proteine. Sowohl von PAG als auch von NKEF-B wurden mehrere unabhängige Klone isoliert. Die Klone kodierten für unterschiedliche Bereiche der PAG und NKEF-B -Proteine, jedoch enthielten alle zumindest den C-terminalen Bereich (Abb. 8B). Die cDNA mit der minimalsten Größe kodierte für den Bereich ab Aminosäure 100 in NKEF-B und Aminosäure 127 in PAG. PAG und NKEF-B gehören zu einer Familie von Proteinen mit Antioxidantfunktion, sogenannte Peroxiredoxine, deren Mitglieder untereinander einen hohen Homologiegrad

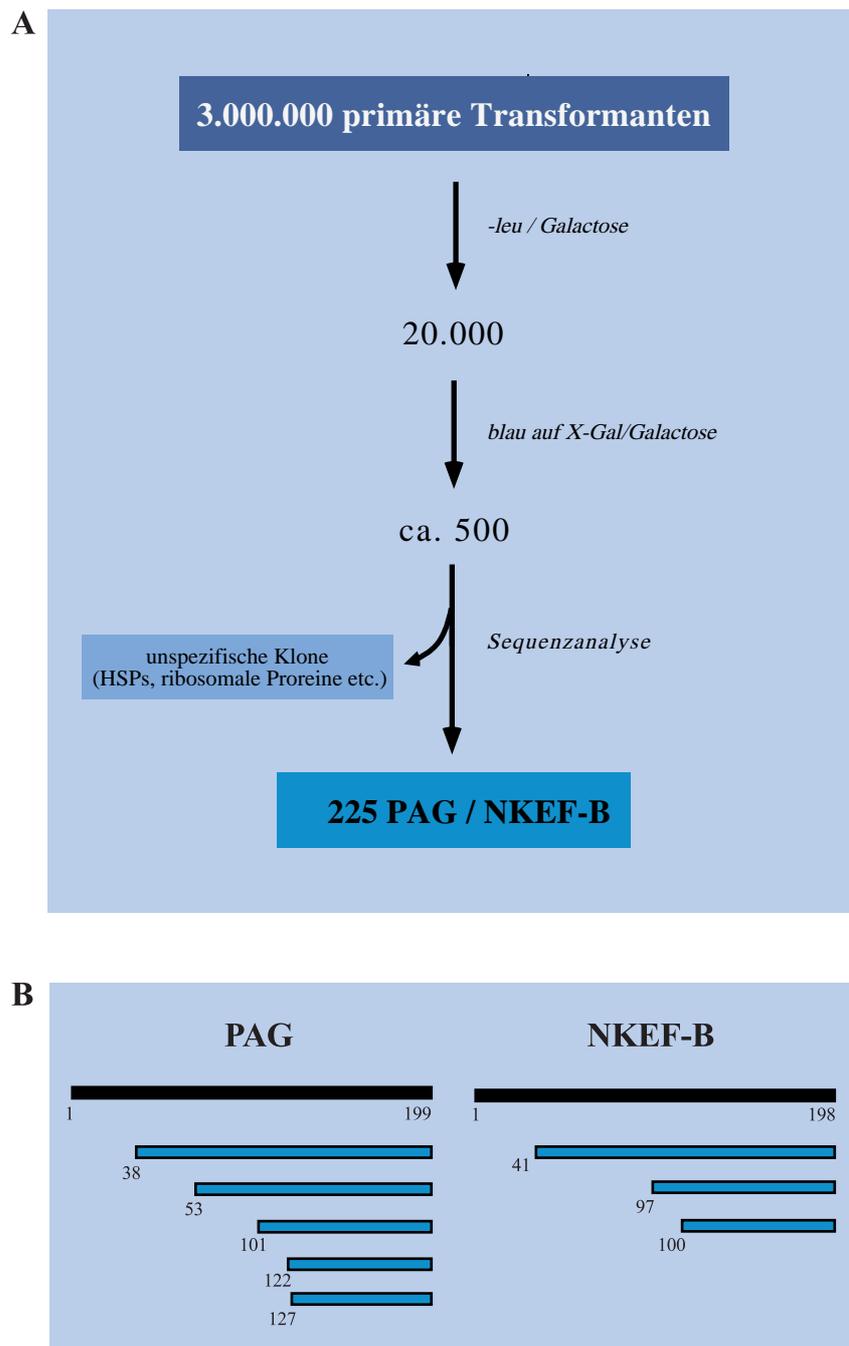


Abb. 8 Schematische Darstellung der Durchführung des „two-hybrid screen“ mit LexA v-JunTAD2 als „bait“-Protein.

Der Hefestamm EGY48 wurde zunächst mit dem LexA v-JunTAD2-Konstrukt und den LexA-abhängigen *leu2*- und *lacZ*-Reportergeräten konstruiert. Anschließend wurden die Expressionsplasmide transformiert, die eine Galaktose-abhängig exprimierbare Fusion aus einer cDNA-Bank mit der B42 Transaktivierungsdomäne enthielten (Stratagene). Die Transformationseffizienz wurde durch Ausstreichen eines Teils des Transformationsansatzes auf Leucin-haltigem Medium bestimmt. Der Rest des Ansatzes auf Wachstum auf Leucin-freiem, Galaktose-haltigem Medium getestet. Nach einer Selektion auf Galaktose- und X-Gal-haltigem Medium verblieben 500 positive Kolonien, die einer Sequenz-Analyse unterzogen wurden.

aufweisen. Homologien zu Proteinen außerhalb dieser Familie sind bisher nicht bekannt. Die Peroxiredoxine sind eine Familie von Proteinen mit einer molekularen Masse von 20-29 kDa. Sie wurden bereits aus verschiedenen Prokaryonten, tierischen und pflanzlichen Zellen isoliert (Chae et al., 1994). Ihre Expression konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, darunter Gehirn, Bauchspeicheldrüse, Pankreas, glatte Muskelzellen, Leber und Osteoblasten (Watabe et al., 1994; Takeda et al., 1993; Siow et al., 1995; Hochstrasser et al., 1992; Iwahara et al., 1995; Kawai et al., 1994). Das PAG Gen wird konstitutiv in den meisten menschlichen Zellen, nach Serum-Stimulation jedoch mit erhöhter Effizienz exprimiert (Prosperi et al., 1993). Die PAG-cDNA kodiert für ein 22 kD großes Protein. Das homologe Protein aus Maus wurde als Macrophagen Protein (MSP23) kloniert und wird durch oxidativen Stress induziert (Ishii et al., 1993). Als weiteres homologes Protein wurde OSF-3 identifiziert. Dieses wird während der Osteoblasten Differenzierung verstärkt exprimiert (Kawai et al., 1994). Auch das MER5 Gen kodiert für ein Protein dieser Familie. MER5 wird während der frühen Phase der Differenzierung von Maus-Erythroleukämie-Zellen (MEL) induziert (Yamamoto et al., 1989). NKEF-A, das mit PAG identisch ist, wurde zusammen mit NKEF-B als ein Faktor identifiziert, der die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen erhöht (Shau et al., 1994). Für PAG konnte wiederum gezeigt werden, dass es an die SH3-Domäne des c-Abl Proteins bindet und als physiologischer Inhibitor der c-Abl Tyrosin-Kinase agiert (Wen und Van Etten, 1997).

5.2.3 PAG und NKEF-B interagieren spezifisch mit der v-Jun Transaktivierungsdomäne

Um zu überprüfen, ob PAG bzw. NKEF-B spezifisch an v-JunTAD2 bindet, wurden verschiedene LexA Fusionsproteine auf Interaktion mit den Galaktose-abhängig exprimierten B42-PAG und B42-NKEF-B Proteinen überprüft. Zwei aus dem „two-hybrid-screen“ isolierten Plasmide (Abb. 9A) wurden in den Hefestamm EGY48 transformiert, der ein LexA abhängiges *lacZ*-Reportergen trug. Durch Ausstreichen der transformierten Kolonien auf Medium mit Glukose, in der Anwesenheit von X-Gal, wurde die Aktivität der LexA Fusionsproteine bestimmt (Abb. 9B). Je aktiver die verwendeten LexA Fusionsproteine sind, desto mehr X-Gal wird durch die β -Galaktosidase umgesetzt und die Kolonien färben sich dunkel. Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität und damit

Blaufärbung der Hefekolonien auf Galaktose-haltigem Medium zeigt eine Interaktion der LexA-Fusionsproteine mit PAG oder NKEF-B an. Die Interaktion zwischen v-Jun TAD2 und PAG/NKEF-B konnte bestätigt werden. Kolonien, die LexA v-Jun TAD1 exprimieren, zeigen, im Vergleich zu

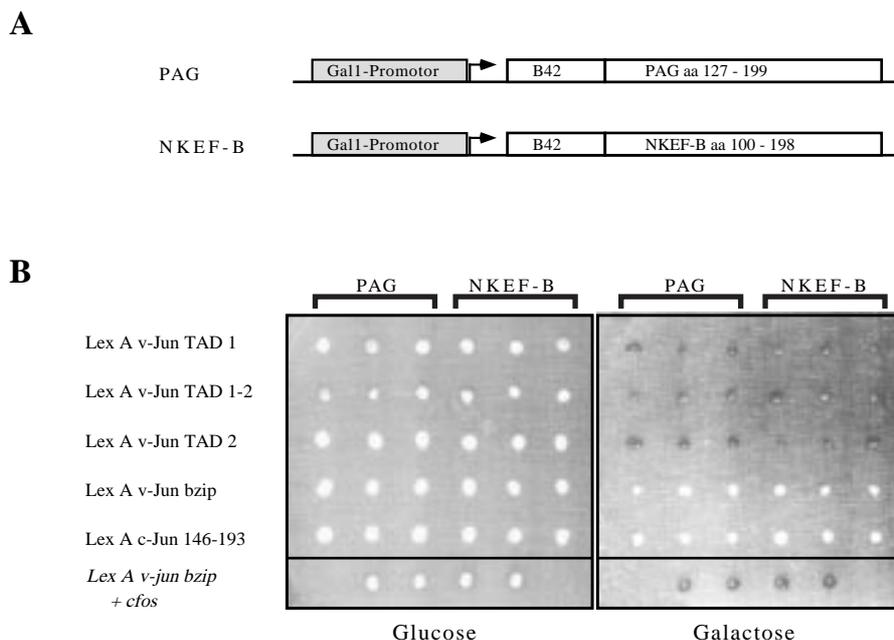


Abb. 9 Spezifität der Interaktion zwischen PAG/NKEF-B und der v-Jun Transaktivierungsdomäne.

A. Zwei der aus dem „two-hybrid screen“ isolierten und für PAG bzw. NKEF-B kodierenden B42-Fusionskonstrukte sind schematisch dargestellt. Sie kodieren für die C-terminalen Hälften von PAG und NKEF-B. B. Sie wurden in den *S.cerevisiae* Stamm EGY48 zusammen mit den angegebenen LexA v-Jun- und c-Jun-Expressionsplasmiden und einem LexA abhängigen *lacZ*-Reportergenkonstrukt kotransformiert. Die daraus resultierenden Kolonien wurden auf Medium punktförmig aufgebracht, das X-Gal und zusätzlich entweder Glukose oder Galaktose enthielt. Blaufärbung der Kolonien auf Galaktose-haltigem Medium zeigt eine Interaktion zwischen PAG-B42 bzw. NKEF-B und den LexA Fusionsproteinen an. Als Kontrolle wurde die Interaktion zwischen LexA v-JunbZip (bZip-Domäne des v-Jun Proteins, fusioniert an die LexA DNA-Bindedomäne) und Galaktose-abhängig exprimiertem c-Fos nachgewiesen.

uninduzierenden Bedingungen, in Anwesenheit von PAG und NKEF-B deutlich erhöhte β -Galaktosidaseaktivität. Auch LexA v-JunTAD1-2 bindet sowohl an PAG als auch an NKEF-B. Jedoch interagieren PAG und NKEF-B nicht mit LexA v-Jun bZip, sowie LexA c-Jun 146-193, einer Region des c-Jun Proteins, die direkt an dessen Transaktivierungsdomäne angrenzt. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion zwischen

LexA v-Jun bZip (LexA DBD, fusioniert an die bZip-Domäne des v-Jun Proteins) und Galaktose-abhängig exprimiertem c-Fos nachgewiesen. Das Experiment zeigt, dass PAG und NKEF-B spezifisch verschiedene Motive der v-Jun Transaktivierungsdomäne erkennen.

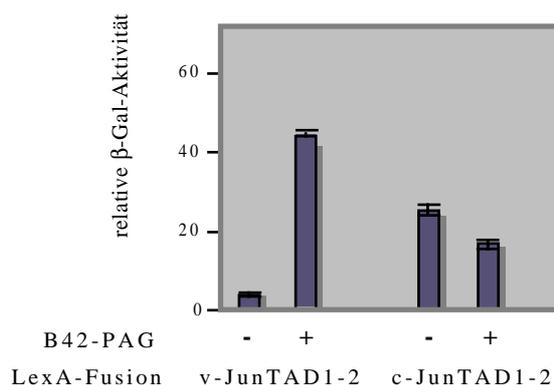


Abb. 10 Die δ -Domäne inhibiert die Interaktion der c-Jun Transaktivierungsdomäne mit PAG.

Die Konstrukte LexA v-JunTAD1-2 und LexA c-JunTAD1-2 wurden zusammen mit dem für B42-PAG (aa127-199) kodierenden Expressionsvektor in den *S.cerevisiae*-Stamm EGY48 transformiert. Als LexA-abhängiges Reportergen wurde *lacZ* verwendet. B42-PAG wird nur in Anwesenheit von Galaktose (+), jedoch nicht bei Zugabe von Glukose (-) exprimiert. Die LexA Fusion wird konstitutiv exprimiert. Die Aktivität des Reportergens wurde im ONPG-Test bestimmt. Es wurden der unabhängige Experimente durchgeführt, deren Mittelwert dargestellt ist.

5.2.4 Die c-Jun δ -Domäne inhibiert die Interaktion von PAG mit der Jun Transaktivierungsdomäne

c-Jun weist eine hohe Homologie zu v-Jun auf. Beide Proteine unterscheiden sich in der Transaktivierungsdomäne hauptsächlich durch Deletion der δ -Domäne im viralen Jun. Die δ -Domäne, die zwischen der c-JunTAD1 und TAD2 liegt, besitzt wichtige regulatorische Funktionen. Sie dient als Andockstelle der JNKs (Jun N-Terminal Kinases) und ist für die ubiquitinabhängige Degradation des c-Jun Proteins essentiell (Musti et al., 1996) Um zu untersuchen, ob die δ -Region auch eine Rolle bei der Interaktion mit PAG spielt, wurde die Bindung von B42-PAG an LexA v-Jun TAD1-2 und LexA c-Jun TAD1-2 verglichen. Nach Transformation des Hefestammes EGY48 mit B42-PAG und LexA v-Jun TAD1-2 bzw. LexA c-Jun TAD1-2 exprimierenden Plasmiden, wurde die Aktivität des LexA

abhängigen *lacZ*-Reportergens unter Anwendung des ONPG-Tests quantitativ bestimmt (Abb. 10). Unter Galaktosebedingungen, also in der Anwesenheit von B42-PAG (+) ist die Aktivität von LexA v-Jun TAD1-2 ca. 10fach erhöht, während die Aktivität des LexA c-Jun Proteins im wesentlichen unverändert bleibt. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass PAG tatsächlich ausschließlich mit der v-Jun Transaktivierungsdomäne, jedoch nicht mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne interagiert.

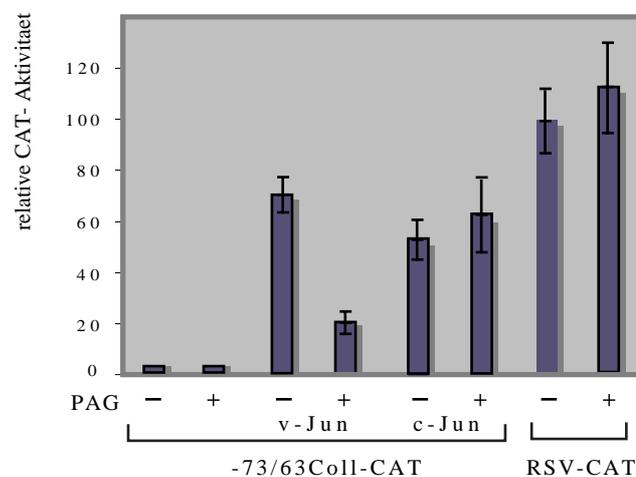


Abb. 11 Die Aktivität von v-Jun wird durch PAG-Überexpression reduziert.

Je 3 µg RSV v-Jun oder RSV c-Jun wurden wie angegeben mit 10 µg RSV-PAG Expressionsvektor (+) oder dem RSV-0 Kontrollvektor (-) in F9-Zellen kotransfiziert. Als Reporter gen (je 6 µg) diente entweder das AP-1 abhängige -63/73 Coll-CAT-Konstrukt oder RSV-CAT. Die Zellen wurden nach 20 h geerntet, Proteinextrakte präpariert und die Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität bestimmt (CAT-Assay). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten.

5.2.5 PAG inhibiert die v-Jun Aktivität in F9-Teratokarzinomazellen

Um die Funktion von PAG in Bezug auf c-Jun und v-Jun in Säugerzellen zu untersuchen, sollten PAG und c-Jun oder v-Jun zusammen in F9-Teratokarzinomazellen exprimiert werden. F9-Zellen wurden gewählt, da sie eine sehr geringe endogene Expression der AP-1 Proteine aufweisen. Hierfür musste das PAG-Gen in einen Expressionsvektor kloniert werden, dessen Promotor in F9-Zellen konstitutiv aktiv ist. Es wurde ein Vektor gewählt, der eine Expression des betreffenden Gens unter der Kontrolle des LTR (long terminal repeat) des RSV (rouv sarcoma virus) erlaubt. Im „two-hybrid screen“ wurden keine

cDNAs isoliert, die für das gesamte Protein kodieren. Daher wurde mRNA aus HeLA-Zellen präpariert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe des Oligonucleotid-Paares Paares PAG (sense, BamHI) und PAG (antisense, EcoRI) wurde die für PAG kodierende cDNA in ihrer vollen Länge amplifiziert und in den RSV-Expressionvektor kloniert. Die Expressionsvektoren RSV v-Jun bzw. RSV c-Jun wurde zusammen mit RSV-PAG oder mit dem leeren Vektor in F9 Zellen transient transfiziert und die Aktivität des kotransfizierten, AP-1 abhängigen -73/63 Coll-CAT-Reportergens bestimmt (Abb. 11, Angel et al., 1987). In Gegenwart von PAG ist die v-Jun Aktivität um ca. 60% reduziert. Hingegen ist das c-Jun Transaktivierungspotential unbeeinflusst. Die geringe Steigerung der Aktivität lässt sich auf einen Einfluss von PAG zurückführen. Der Befund legt somit dar, dass eine Überexpression von PAG spezifisch die Aktivität von v-Jun, jedoch nicht von c-Jun hemmt.

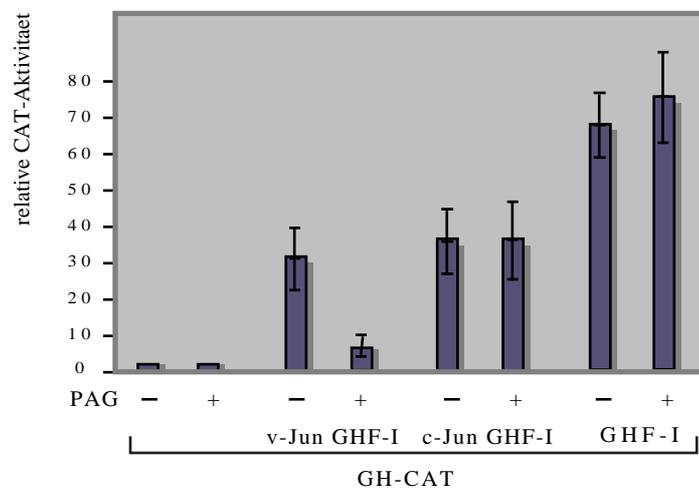


Abb. 12 Die PAG vermittelte Inhibition von v-Jun ist abhängig von der v-Jun Transaktivierungsdomäne.

Jeweils 3 µg der Expressionsplasmide RSV v-Jun GHFI, RSV c-Jun GHF-I und RSV GHFI bzw. des Kontrollvektors RSV-0 wurden zusammen mit 6 µg des GHF-I abhängigen Reportergenkonstrukts in F9-Zellen transformiert. Gleichzeitig wurden jeweils 10 µg RSV-PAG (+) oder RSV-0 (-) transfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen geerntet, Proteinextrakte präpariert und die CAT-Aktivität bestimmt. Es wurden drei unabhängige Transfektionen durchgeführt, deren Mittelwerte grafisch dargestellt sind.

5.2.6 Die PAG vermittelte Inhibition von v-Jun ist abhängig von der v-Jun Transaktivierungsdomäne

Im „two-hybrid screen“ interagiert PAG ausschließlich mit der v-Jun Transaktivierungsdomäne. Es sollte nun untersucht werden, ob für die beobachtete Inhibition der v-Jun Aktivität in F9-Zellen die Transaktivierungsdomäne ausreichend ist. Expressionsplasmide, die für Fusionen aus v-Jun oder c-Jun Transaktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne des heterologen Transkriptionsfaktors GHF-I (pituitary specific transcription factor) kodieren, wurden in F9 Teratokarzinomazellen transient transfiziert. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Plasmid verwendet, das das Gen des gesamten GHF-I Transkriptionsfaktors trug. Alle Proteine wurden unter dem Einfluss des RSV-Promotors exprimiert. Die Aktivität der Fusionsproteine wurde mit Hilfe des GHF-I abhängigen GH (growth hormone)-CAT Reportergens bestimmt (Abb. 12) (Theill et al., 1989). Die transkriptionelle Aktivität des v-Jun GHF-I-Proteins ist, wenn RSV-PAG kotransfiziert wurde, auf die Hälfte bis ein Drittel reprimiert. Hingegen aktiviert das GHF-I Protein den GH-Promotor in Ab- und Anwesenheit von PAG in gleichem Umfang. PAG vermag auch die Aktivität von c-Jun GHF-I nicht zu beeinflussen. Da die Aktivität des v-Jun GHF-I-Proteins, jedoch nicht die des GHF-I- oder c-Jun GHF-I-Proteins durch PAG gehemmt wird, zeigen die vorliegenden Befunde, dass die Transaktivierungsdomäne von v-Jun das spezifische Ziel des PAG-Proteins darstellt.

5.2.7 Die Expression von PAG in F9-Zellen führt zu verminderten v-Jun Proteinmengen, die sich auf erhöhte Degradation zurückführen lassen - ein Effekt, der unabhängig ist von der Antioxidantfunktion des PAG Proteins

Es sind verschiedene Modelle vorstellbar, wie PAG die Aktivität des v-Jun Proteins reprimiert. Beispielsweise könnte PAG strukturelle Veränderungen der Transaktivierungsdomäne induzieren oder die Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie hemmen. Repression durch PAG könnte aber auch mit verminderten v-Jun Proteinmengen erklärt werden. Daher sollte die Menge des v-Jun Proteins in F9-Zellen, nach Überexpression von PAG bestimmt werden. Die Zellen wurden mit RSV v-Jun oder RSV c-Jun und RSV PAG (wt) bzw. dem leeren RSV-

Expressionvektor kotransfiziert. Es wurden Proteinextrakte aus den Zellen präpariert und die Mengen an v- und c-Jun Proteinen durch Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 13B). Die Menge des v-Jun Proteins ist in Anwesenheit von PAG signifikant um das 10fache reduziert (Abb. 13B, Spuren 1 und 2). Die Menge des exogenen c-Jun blieb unverändert (Abb. 13B Spuren 4 und 5). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die oben diskutierten Mechanismen in der Repression der v-Jun Aktivität durch PAG eine Rolle spielen. Jedoch zeigten die Untersuchungen, dass der beobachtete Effekt zumindest teilweise auf eine Reduktion der v-Jun Proteinmengen zurückgeführt werden kann.

PAG, NKEF-A, sowie das homologe Protein TSA (thiol-specific antioxidant) aus *S.cerevisiae* gehören zu einer Proteinfamilie mit Antioxidantfunktion. Wird in TSA Cys47 gegen Serin ausgetauscht, so führt dies zum Verlust seiner Fähigkeit zu Dimerisieren und seiner Funktion als Antioxidant (Chae et al., 1994). Dieser Cysteinrest, der sich in PAG an Position 52 befindet, ist innerhalb der verschiedenen Mitgliedern der Proteinfamilie hochkonserviert. Um zu untersuchen ob für die Repression der v-Jun Aktivität die Antioxidantfunktion des PAG Proteins notwendig ist, wurde eine mutantes PAG (C52S) hergestellt, in dem Cys52 gegen Ser ausgetauscht ist (Abb. 13 A). Hierfür wurden mit Hilfe der PCR und den Oligonucleotiden PAG(sense, BamHI), PAG(antisense, EcoRI), PAG-C52S(sense) und PAG-C52S(antisense) gezielte Mutationen in der für PAG kodierenden DNA erzeugt („site specific mutagenesis“) und anschließend die amplifizierten DNA-Fragmente unter Verwendung der generierten Restriktionsstellen in den RSV-Expressionsvektor kloniert. RSV v-Jun und RSV c-Jun wurden zusammen mit RSV C52S in F9-Zellen kotransfiziert und die überexprimierten Jun-Proteine durch Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 13B, Spuren 1 und 3, 4 und 5). Auch nach Überexpression von C52S kann eine Reduktion der v-Jun, jedoch nicht der c-Jun Proteinmengen beobachtet werden. Das Protein PAG Δ N ist eine mutante Form von PAG, bei der der N-Terminus bis Aminosäure 127 deletiert ist. Es wird von der aus dem „two-hybrid screen“ stammenden cDNA kodiert, die die geringste Größe besaß. Wie Abb. 13C zeigt, kann sogar die gesamte N-terminale Hälfte des PAG-Proteins deletiert werden, ohne dessen Funktion in Bezug auf die Degradation des v-Jun Proteins zu zerstören.

Die in Anwesenheit von PAG beobachtete Reduktion der v-Jun Proteinmenge kann durch erhöhte Degradationsraten erklärt werden. Die Degradation der c-Jun Proteine erfolgt über mehrere Wege. c-Jun wird nach spezifischer Ubiquitinierung von einem multikatalytischen Protease-Komplex, dem Proteasom, abgebaut (Treier et al., 1994). c-Jun und v-Jun wurden

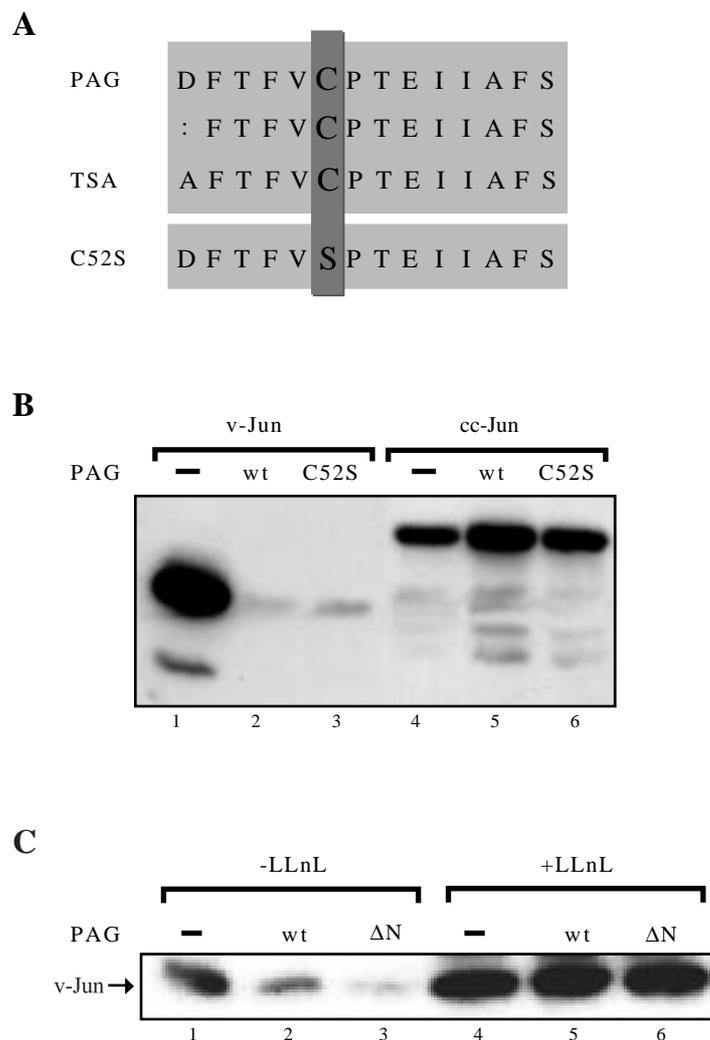


Abb. 13 Bestimmung der Jun-Proteinmengen nach Überexpression von PAG bzw. PAG C52S und in Anwesenheit des Proteaseinhibitors LLnL.

A. Homologievergleich von PAG und TSA (Thiol-Specific Anitoxidant). Es ist die Region um das konservierte Cystein 52 in PAG dargestellt. C52S zeigt die Mutation des Cystein 52 nach Serin an. B. 3 μ g des Expressionsvektors RSV v-Jun oder RSV cc-Jun (chicken c-Jun) wurden mit jeweils 10 μ g RSV-0 (-), RSV PAG (wt) oder RSV PAGC52S (C52S) transformiert, die Zellen nach 20 h geerntet und Proteinextrakte präpariert. Die Proteinkonzentrationen in den Proteinextrakten wurden mit Hilfe des Lowry-Tests bestimmt. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen und der Aufgabe durch Ponceau-Färbung nachgeprüft. Die Mengen an Jun-Proteinen wurde in einer Westernblot-Analyse bestimmt. Signale unterhalb der Hauptbanden stammen von Abbauprodukten. C. Je 3 μ g des RSV v-Jun Expressionsplasmides wurden zusammen mit 10 μ g RSV-0 bzw. RSV-PAG (wt) oder RSV-PAG Δ N (Δ N) in F9-Zellen transfiziert. Nach 10 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Proteaseinhibitor LLnL, der in Methanol gelöst war, in einer 100 mM Konzentration zugefügt (+LLnL). Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment unter Zugabe des Lösungsmittels Methanol durchgeführt (-LLnL). Nach weiteren 10 h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte präpariert. Die Mengen an v-Jun wurden in einer Westernblot-Analyse ermittelt.

aber auch als *in-vivo* Substrate der Calpaine beschrieben (Hirai et al., 1991; Carillo et al., 1994; Pariat et al., 2000). Calpaine sind ubiquitäre cytoplasmatische Cystein-Proteasen, die durch Calcium aktiviert werden (Suzuki et al., 1995) Ein effizienter Inhibitor beider Wege ist LLnL (N-Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal oder Calpain Inhibitor I), ein membranpermeabler Inhibitor von Cystein-Proteasen (Vinitsky et al., 1992). Um zu überprüfen, ob die Reduktion der v-Jun Proteinmengen auf erhöhter Degradation beruht, wurde die Aktivität des Proteasoms und der Calpaine mit Hilfe von LLnL gehemmt (Abb. 13C). Hierfür wurde das v-Jun Protein einmal alleine, dann zusammen mit PAG wildtyp (wt) oder PAG Δ N in F9-Zellen exprimiert. Die Menge des v-Jun Proteins wurde durch Westernblot-Analyse nachgewiesen. Unter dem Einfluss von PAG ist die Menge des v-Jun Proteins reduziert. Auch die Überexpression von PAG Δ N führt zu verminderten v-Jun Proteinmengen. Bei Zugabe des Inhibitors LLnL kann (1) eine Stabilisierung des v-Jun Proteins beobachtet werden und (2) wird die in Anwesenheit von PAG und PAG Δ N beobachtete Reduktion der v-Jun Proteinmengen unter dem Einfluss des Proteinasehemmers LLnL vollständig aufgehoben. Die Studie weist darauf hin, dass die Überexpression von PAG zu einem verstärkten Abbau des v-Jun Proteins führt und dass für eine erhöhte v-Jun Degradation die Antioxidantfunktion von PAG nicht benötigt wird.

5.3 Die Rolle von hTAFII55 in der c-Jun vermittelten Transaktivierung

5.3.1 Überexpression von hTAFII55 erhöht das c-Jun Transaktivierungspotential in HEK293 Zellen

Im „two-hybrid screen“ konnten keine Faktoren isoliert werden, die als Koaktivatoren fungieren. Daher sollten nun solche Proteine auf ihre Rolle in der Jun-abhängigen Transaktivierung getestet werden, für die bereits eine Funktion als Koaktivator bekannt war. Als Teil der RNA-Polymerase II Transkriptionsmaschinerie besitzen einige TAFs diese Aufgabe (Liebermann et al., 1994; Thut et al., 1995; Burley und Roeder, 1996). Es konnte jedoch bisher für keine der bekannten TAFs eine Funktion in der c-Jun abhängigen Transaktivierung oder eine Interaktion mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne nachgewiesen werden (Sybille Teurich; Alex Pintzas, unveröffentlichte Daten). Ein bislang noch nicht getesteter TAF ist hTAFII55. hTAFII55 besitzt die Eigenschaft, dass er mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren unterschiedlicher Art interagiert, unter anderem auch solche mit sauren Transaktivierungsdomänen (Austen et al., 1997; Lavigne et al., 1999). Da auch die Jun-Proteine saure Transaktivierungsdomänen besitzen, könnte hTAFII55 eine Rolle in der Jun abhängigen Transaktivierung spielen.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von hTAFII55 das Transaktivierungspotential von c-Jun erhöht, wurde eine konstante Menge eines c-Jun-Expressionsvektors zusammen mit steigenden Mengen eines hTAFII55-Expressionsvektors in HEK293 Zellen transfiziert. Die transkriptionelle Aktivität des c-Jun Proteins wurde mit Hilfe des AP-1 abhängigen -73/63 Coll-CAT Reportergens bestimmt (Abb. 14 A und B). Da in HEK293 Zellen verschiedene Mitglieder der AP-1 Familie, darunter auch c-Jun, konstitutiv exprimiert werden, ist der -73/63 Coll-CAT Reporter in diesen Zellen leicht aktiv. Die Transfektion des RSV c-Jun Expressionsvektors führt zu einer 7-8fachen Erhöhung der -73/63Coll-CAT-Reporteraktivität. Bei steigenden Mengen hTAFII55, wird jedoch dieser Wert noch um etwa das 4fache erhöht. c-Jun und hTAFII55 wurden unter der Kontrolle des RSV-Promotors exprimiert. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt indirekt auf einer erhöhten Aktivität des RSV-Promotors und damit erhöhten c-Jun Proteinmengen beruht, wurde die RSV-Promotoraktivität bestimmt.

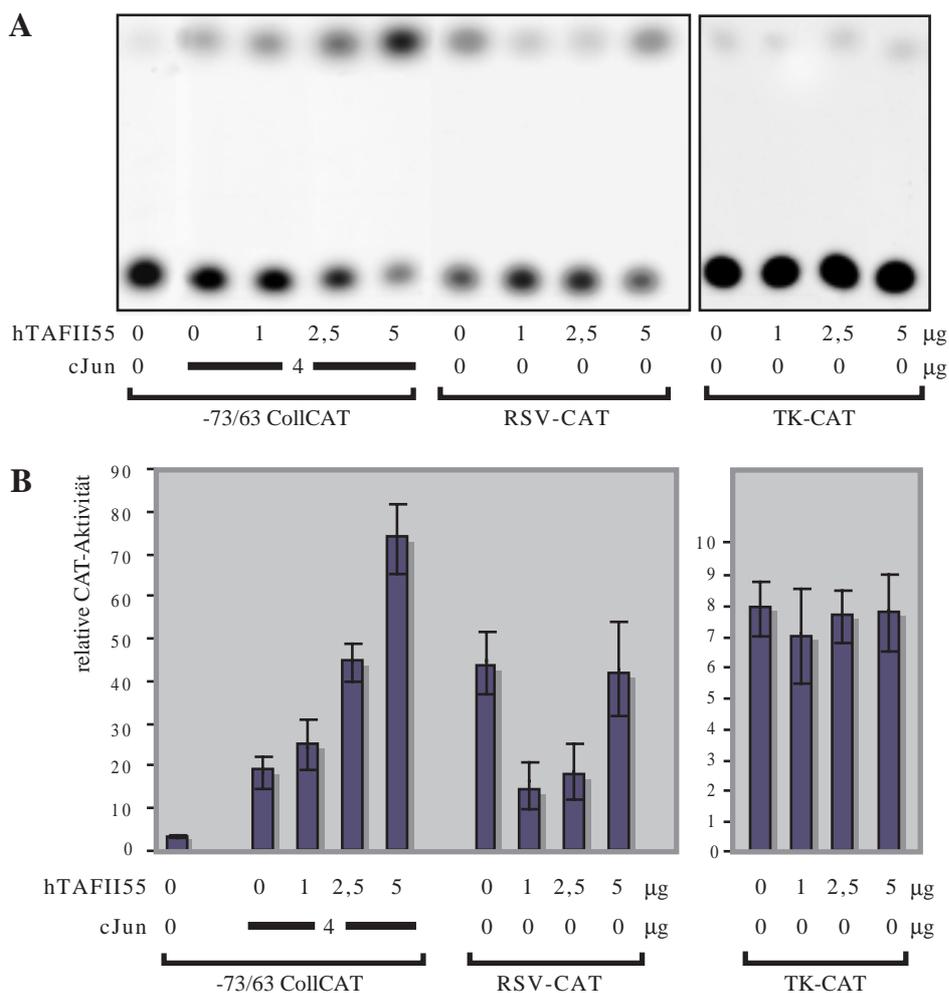


Abb. 14 Überexpression von hTAFII55 erhöht das c-Jun Transaktivierungspotential in HEK 293-Zellen.

Die Expressionsvektoren RSV hTAFII55 und RSV c-Jun wurden in den angegebenen Mengen in HEK293 Zellen transfiziert. Als Reportergene wurden 5 μg -73/63 Coll-CAT, 5 μg TK-CAT und 3 μg RSV-CAT verwendet. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Proteinextrakte präpariert und eine CAT-Aktivitätsanalyse durchgeführt. **A.** Autoradiographie der Analyse der CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase)-Aktivität. Signale im unteren Bereich der Abbildung stellen nicht umgesetztes Chloramphenicol dar. Signale im oberen Bereich stammen von acetyliertem Chloramphenicol. **B.** Die Mittelwerte der CAT-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten wurden berechnet und grafisch dargestellt.

Überexpression von hTAFII55 führt nicht zu einer Steigerung der RSV-Promotoraktivität. Vielmehr verliert der RSV-Promotor bei steigenden hTAFII55 Mengen an Aktivität. Bei hohen Mengen an hTAFII55 erreicht er wieder den Anfangswert. Die erhöhte Aktivität des c-Jun abhängigen -63/73 Coll-CAT Reportergens ist folglich nicht das Resultat einer Stimulation des RSV-Promotors, sondern einer spezifischen Wirkung von hTAFII55 auf c-Jun abhängige Transkription. Um zu überprüfen, ob hTAFII55-Überexpression die basale

Transkription beeinflusst, wurden das TK (Thymidinkinase)-Reportergenkonstrukt und steigende Mengen des Expressionsvektors RSV-hTAFII55 in HEK293-Zellen kotransfiziert. Der TK-Promotor, dessen Aktivität von einer CTF und zwei Sp1-Bindestellen abhängt (Ben-Hattori et al., 1989), zeigt eine leichte basale Aktivität, die durch hTAFII55 nicht beeinflusst wird. Überexpression von hTAFII55 führt in HEK293 Zellen somit nicht zu einer generellen transkriptionellen Aktivierung, sondern zu einer spezifischen Stimulation der c-Jun abhängigen Transkription.

5.3.2 c-Jun interagiert mit hTAFII55

Da hTAFII55 nach Überexpression die Transaktivierung durch c-Jun verstärkt, sollte geprüft werden, ob es mit c-Jun interagiert und damit als Brücke zwischen c-Jun und der Transkriptionsmaschinerie dienen kann. Hierfür wurde hTAFII55 zunächst als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und über Glutathionagargose affinitätsgereinigt. Abb. 15 A zeigt das Proteinmuster des Gesamtextrakts (Spur 1 Gesamtextrakt; Spur2 lösliche Fraktion), der aus einer GST hTAFII55-exprimierenden *E.coli*-Kultur gewonnen wurde, und das daraus gereinigte Protein (Spur 3). Als Negativkontrolle für die Interaktionsstudie wurde GST v-JunTAD Δ 6-91 gewählt. Dieses Protein enthält einen Teil der v-Jun Transaktivierungsdomäne, jedoch nicht die bZip-Domäne und kann daher nicht mit c-Jun interagiert. GST v-JunTAD Δ 6-91 wurde ebenfalls in *E.coli* exprimiert und gereinigt (Abb. 15A; Spuren 4-6). Das c-Jun Protein wurde durch *in-vitro* Translation im Retikulocytenlysate hergestellt und unter Verwendung radioaktiven ³⁵S-Methionins markiert. c-Jun wird im Retikulocytenlysate phosphoryliert (Hagmeyer et al., 1993). Unphosphoryliertes (u) und phosphoryliertes (p) c-Jun können aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Abb. 15B; Spur 1). Es wurde untersucht, ob c-Jun an GST hTAFII55 bindet und unter Einsatz einer Glutathion-Matrix zusammen mit GST hTAFII55 kopräzipitiert werden kann („GST-Pulldown“). Unphosphoryliertes und phosphoryliertes c-Jun interagieren gleich effizient mit GST hTAFII55 (Abb.15B; Spur 5). Eine unspezifische Interaktion von c-Jun mit der

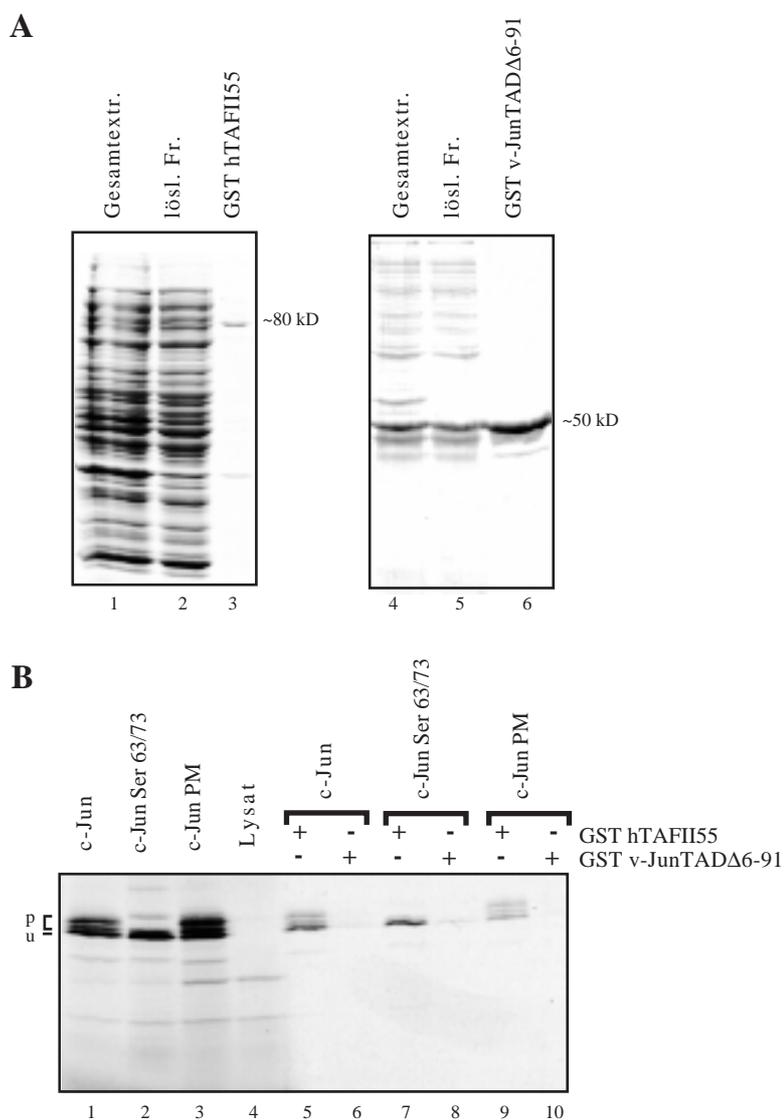


Abb. 15 *In-vitro* Interaktion zwischen hTAFII55 und c-Jun.

A. Proteinextrakte aus E.coli Kulturen, die GST hTAFII55 oder GST v-JunTADΔ6-91, bzw. die gereinigten GST-Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. **B.** c-Jun, c-Jun Ser63/73 und c-Jun PM wurden durch *in-vitro*-Translation im Retikulozytenlysat hergestellt. Dabei wurden sie radioaktiv markiert. Um die Interaktion der Jun-Proteine mit GST hTAFII55 oder GST v-JunTADΔ6-91 zu testen, wurde ein „GST-Pulldown“ durchgeführt. Die radioaktiv markierten Jun-Proteine wurden mittels Autoradiografie visualisiert. Spuren 1-3 zeigen 1/5 der Menge der eingesetzten Translationsprodukte. In Spur 4 wurde Lysat aufgetrennt, in dem eine Translationsreaktion ohne Matrizen-RNA durchgeführt wurde. p zeigt phosphoryliertes, u unphosphoryliertes c-Jun an.

GST Fusion kann ausgeschlossen werden, da c-Jun im Präzipitat nicht nachgewiesen werden konnte, wenn GST v-Jun Δ 6-91 eingesetzt wurde (Spur 6). Folglich interagiert hTAFII55 direkt mit c-Jun und zwar unabhängig vom c-Jun Phosphorylierungsstatus.

Um zu prüfen, ob die Phosphorylierungsstellen von c-Jun, Ser63/73 sowie 243/249, für die Interaktion mit hTAFII55 benötigt werden, wurden c-Jun Mutanten untersucht, deren Serinreste an den betreffenden Positionen gegen Alaninreste ausgetauscht wurden. Die Proteine wurden ebenfalls durch *in-vitro* Translation hergestellt und radioaktiv markiert (Abb. 15B, Spur 2). c-Jun Ser63/73, in dem Serin 63 und 73 durch Alanin ersetzt sind, wird mit der gleichen Effizienz präzipitiert wie c-Jun (Abb. 15B, Spur 7,8).

In c-Jun PM sind die Serinreste 243/249 der bZip Region gegen Alaninreste ausgetauscht worden (Hagmeyer et al., 1993). Die Mutation der Serine in der bZip Domäne zeigt keinen Einfluss auf die Interaktion mit hTAFII55 (Abb. 15B, Spur 3, 9, 10). Die Interaktionsstudien zeigen, dass hTAFII55 und c-Jun unabhängig von den Phosphorylierungsstellen S63/73 und Ser 243/249 des c-Jun Proteins interagieren.

5.3.3 hTAFII55 interagiert mit der bZip Region des c-Jun Proteins

Um die für die Interaktion mit hTAFII55 notwendigen Domäne in c-Jun zu definieren, wurden c-Jun Deletionsmutanten, in denen verschiedene N-terminale Bereiche des Jun Proteins partiell oder vollständig deletiert sind, auf Interaktion mit GST hTAFII55 getestet (Abb. 16A) (Angel et al., 1989) Alle c-Jun Proteine wurden durch *in-vitro* Translation im Retikulocytenlysat hergestellt und radioaktiv markiert (Abb. 16B, Spur 1-5). Die Deletion der glutamin- und prolinreichen Region (schwarze Box, Aminosäure 194-223) zeigt keinen Einfluss auf die Interaktion mit GST hTAFII55 (Abb. 16B, Spur 8+9). Auch c-Jun Δ 146-221 kann mit der gleichen Effizienz an GST hTAFII55 binden wie c-Jun (Spur 14,15). c-Jun Δ 6-194 und Δ 6-223 fehlt der gesamte N-terminale Bereich. Dennoch werden sie durch GST hTAFII55 kopräzipitiert (Spuren 8, 9 und 12, 13). Für die Interaktion mit hTAFII55 ist somit die c-Jun bZip Region hinreichend. Alle untersuchten c-Jun Proteine interagieren spezifisch mit GST hTAFII55, jedoch nicht mit GST v-JunTAD Δ 6-91, welches als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

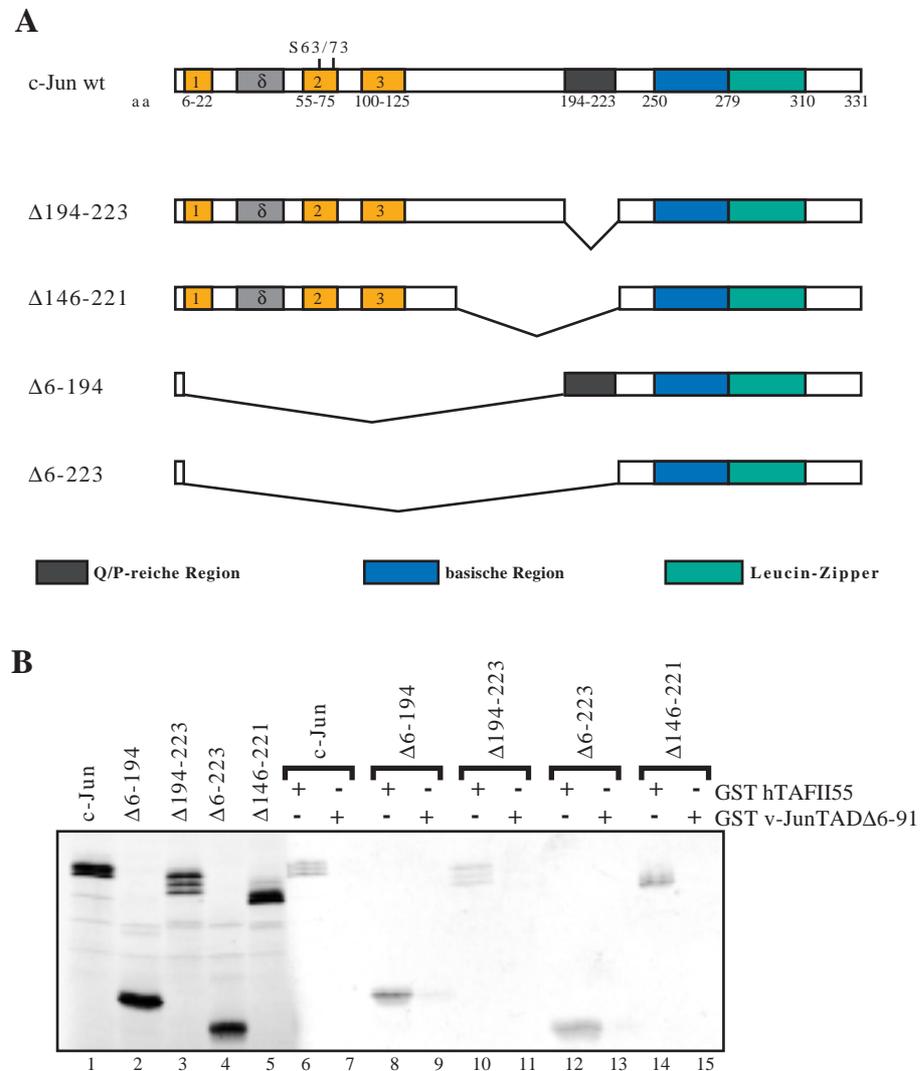


Abb. 16 hTAFII55 interagiert *in-vitro* mit der bZip-Domäne von c-Jun.

A. Schematische Darstellung der verwendeten c-Jun Deletionskonstrukte. Gelbe Boxen zeigen die Position der sauren Regionen in der c-Jun Transaktivierungsdomäne an. Die δ -Domäne wurde in grau dargestellt. Die bZip-Domäne setzt sich aus der basischen Region (in blau) und der Leucin-Zipper-Region (in grün) zusammen. **B.** Die c-Jun Deletionsproteine wurden durch *in-vitro*-Translation hergestellt und radioaktiv markiert. Sie wurden mittels „GST-Pulldown“ auf Interaktion mit GST hTAFII55 und GST v-JunTAD Δ 6-91 getestet. 20 % der Menge der eingesetzten (Spuren 1-5) und 100 % der präzipitierten Jun-Proteine (Spuren 6-15) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiografie sichtbar gemacht.

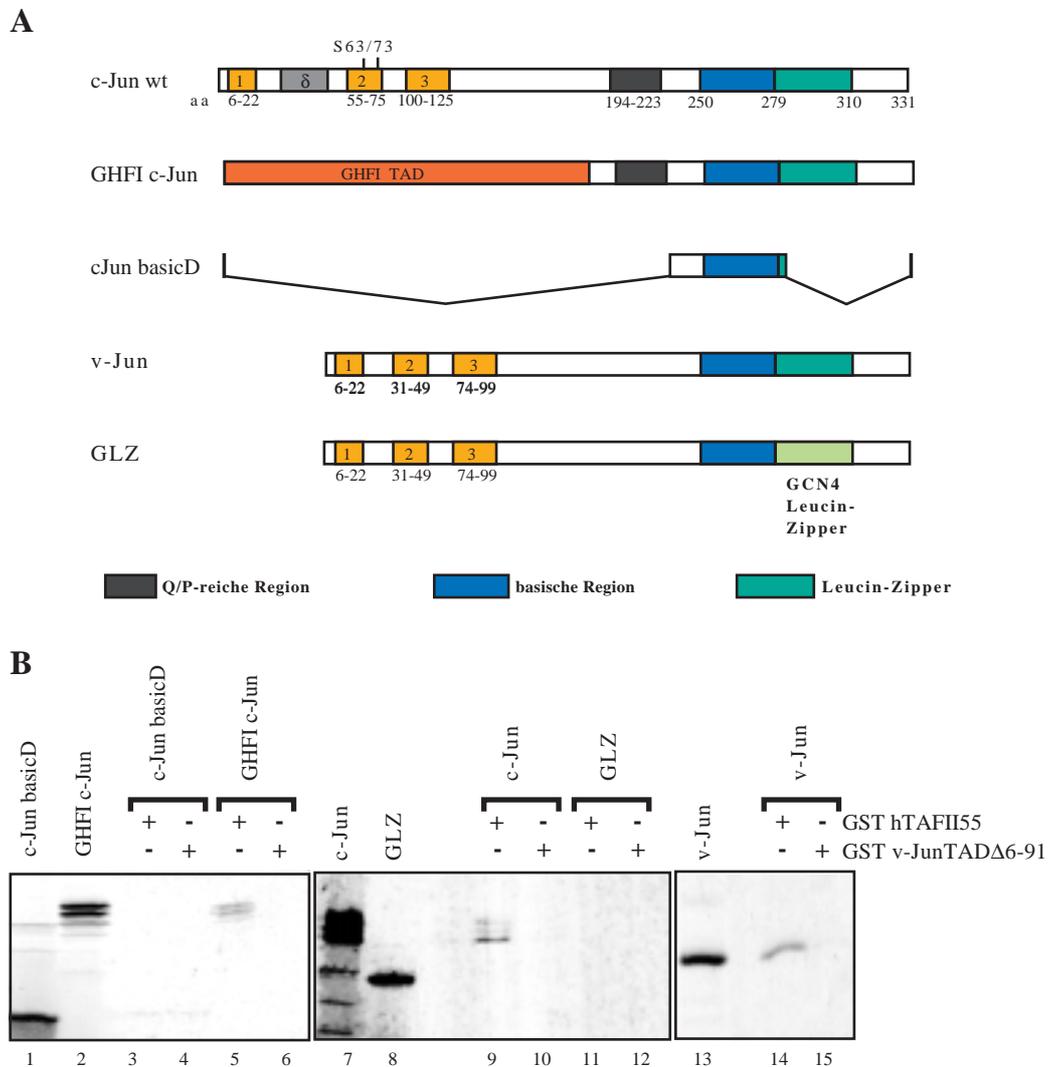


Abb. 17 Der c-Jun Leucin-Zipper ist für die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun DNA-Bindedomäne essentiell.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Jun-Deletions- und Fusionsproteine. Die sauren Regionen der c-Jun oder v-Jun Transaktivierungsdomäne wurden in gelb abgebildet, die δ -Domäne in grau. Die Transaktivierungsdomäne des heterologen Transkriptionsfaktors GHF-I wurde in orange dargestellt. In GLZ wurde der c-Jun Leucin-Zipper (dunkelgrün) gegen den GCN4 Leucin-Zipper (hellgrün) ausgetauscht. Die basische Region von c-Jun (blau) ist in allen verwendeten Proteinen enthalten. **B.** Die in A dargestellten Proteine wurden durch *in-vitro*-Translation im Retikuloeytenlysat hergestellt und dabei radioaktiv markiert. 1/5 der Menge der im eingesetzten Proteine wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (1, 2, 7, 8, 13). Die im „GST-Pulldown“ mit GST hTAFII55 oder GST v-JunTAD Δ 6-91 präzipitierten Proteine wurden ebenfalls aufgetrennt. Durch Autoradiografie wurden die radioaktiv markierten Proteine sichtbar gemacht.

5.3.4 Für die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip-Domäne ist der Leucin-Zipper essentiell.

Die bZip Domäne der Jun Proteine setzt sich aus der basischen DNA-Binderegion und dem Leucin-Zipper zusammen. Dieser ist als Protein-Protein-Interaktionsmotiv beschrieben worden und ist notwendig für die Dimerisierung mit den AP-1 Partnern (Sassone-Corsi et al., 1988; Kouzarides et al., 1988; Gentz et al., 1989; Ransone et al., 1989). Für die Interaktion zwischen c-Jun und hTAFII55 genügt, wie aus den vorangegangenen Experimenten ersichtlich wurde, die bZip Region. Um die Rolle des Leucin-Zippers zu untersuchen, wurde die Mutante c-Jun basicD im Retikulocytenlysat hergestellt. Das mutante Protein besteht ausschließlich aus der basischen Domäne des c-Jun Proteins (Abb. 17A und Abb. 17B, Spur 1). Im „GST-Pulldown“ kann zwischen c-Jun basicD und GST hTAFII55 keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 17B, Spur 3, 4). Hingegen bindet das Fusionsprotein aus der Transaktivierungsdomäne des heterologen Transkriptionsfaktors GHFI und der gesamten bZip Domäne des c-Jun Proteins (GHFI c-Jun) an GST hTAFII55 (Abb. 17A und Abb. 17B, Spur 2, 5,6). Für die Interaktion zwischen c-Jun und hTAFII55 ist demnach die Leucin-Zipper Region des c-Jun Proteins unabdingbar. Da die Leucin-Zipper Region für die Dimerisierung der AP-1 Partner notwendig ist, sollte die Rolle der Jun-Dimerisierung bei der Interaktion mit hTAFII55 geprüft werden. Es wurde eine v-Jun Mutante erzeugt, in der der v-Jun Leucin-Zipper gegen den des GCN4-Proteins ausgetauscht wurde (Abb. 17A). Das resultierende Protein, GLZ, besitzt die Fähigkeit sehr effizient Homodimere zu bilden, jedoch ist die Aminosäuresequenz des GCN4-Leucinzipers von der des v-Jun Leucin-Zippers verschieden. Im „GST-Pulldown“ interagiert das GLZ-Protein nicht mit GST hTAFII55 (Abb. 17B, Spur 8, 11, 12). Hingegen wird wildtyp v-Jun effizient mit GST hTAFII55 kopräzipitiert. Dies bedeutet, dass die spezifische Aminosäureabfolge des c-Jun Leucin-Zippers und nicht nur dessen allgemeine Leucin-Zipper Sekundärstruktur bzw. die Dimerisierung der Jun-Proteine für die Interaktion mit hTAFII55 essentiell ist.

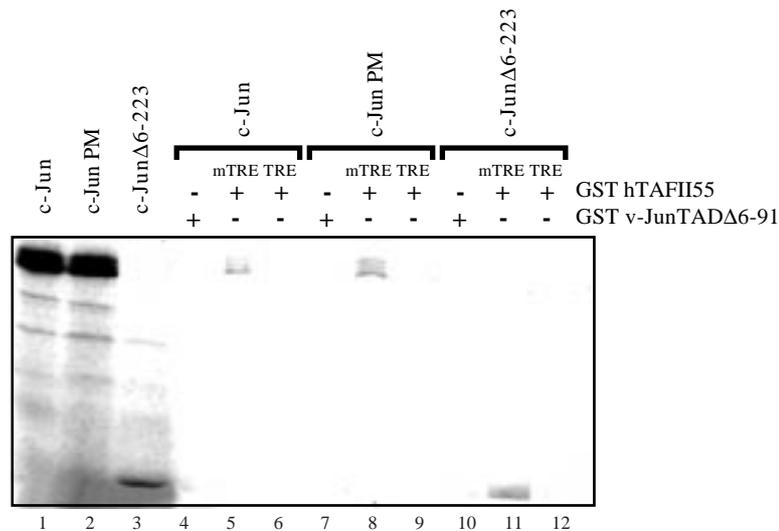


Abb. 18 *In-vitro* Interaktion zwischen hTAFII55 und c-Jun in der Anwesenheit der AP-1 DNA-Konsensussequenz.

c-Jun, c-Jun PM und c-JunΔ6-223 wurden durch *in-vitro* Translation im Retikulozytenlysat hergestellt und im „GST-Pulldown“ auf Interaktion mit GST hTAFII55 oder GST v-JunTADΔ6-91 geprüft. Dies geschah entweder ohne die Zugabe von DNA, nach Zugabe einer mutanten Version der AP-1 Konsensus-DNA (mTRE) oder des funktionellen TRE-Oligonucleotides (TRE). mTRE und TRE wurden in einer Konzentration von 4 ng/μl Reaktionsvolumen eingesetzt. 1/5 der eingesetzten Proteine und das gesamte Präzipitat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Da die Jun-Proteine radioaktiv markiert waren, konnten sie mit Hilfe der Autoradiografie visualisiert werden.

5.3.5 *In-vitro* interagiert DNA-gebundenes c-Jun nicht mit hTAFII55

Das c-Jun Leucin-Zipper-Motiv ist für die Dimerisierung der c-Jun Proteine notwendig. Da c-Jun jedoch nur als Dimer an DNA binden kann, ist es aber auch für die Bindung an DNA zwingend erforderlich (Sassone-Corsi et al., 1988; Gentz et al., 1989). Um zu testen, ob sich c-Jun DNA-Bindung und Interaktion mit hTAFII55 gegenseitig beeinflussen, sollte die Interaktion zwischen bakteriell exprimiertem GST hTAFII55 und c-Jun, in Anwesenheit des AP-1 Konsensusmotivs (TRE, TPA-Response-Element) geprüft werden. c-Jun wurde durch *in-vitro* Translation im Retikulozytenlysat gewonnen. Es wurden zunächst Interaktionsstudien einmal ohne Zugabe von DNA, dann in Anwesenheit einer mutierten Form des TRE-Oligonucleotides (mTRE), und schließlich nach Zugabe des wildtyp TRE durchgeführt. mTRE wird von AP-1 Komplexen, darunter auch c-Jun Homodimeren, nicht erkannt (Schreiber et al., 1999). Die Zugabe des TRE-Oligonucleotides führt zum Verlust der Interaktion zwischen c-Jun und hTAFII55 (Abb. 18, Spur 5, 6). Hingegen wird c-Jun, wenn sich das mTRE-Oligonucleotid in der Reaktion befindet, unter Einsatz einer Glutathion-Matrix, effizient mit GST hTAFII55 kopräzipitiert

(Abb. 18, Spur 4, 5). *In-vitro* werden Komplexe aus c-Jun und TRE folglich nicht von hTAFII55 erkannt. Auch c-Jun PM, in dem die Serinreste der bZip Region durch Alaninreste ersetzt wurden, interagiert zwar mit GST hTAFII55 in Anwesenheit des mTRE, jedoch kann die Interaktion nach Zugabe des wt TRE nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 7-9 und Spur 10-12). Das gleiche Verhalten zeigt die bZip-Domäne des c-Jun Proteins. Sie interagiert mit hTAFII55 wenn kein, oder mutiertes TRE zur Reaktion zugegeben wird. Die Interaktion wird jedoch in Anwesenheit der AP-1 Konsensussequenz verhindert. Dies zeigt, dass die Interaktion zwischen der c-Jun bZip Region und hTAFII55 gestört wird, sobald Jun spezifisch an seine DNA-Erkennungssequenz gebunden ist.

5.3.6 *In-vitro* interagiert rekombinantes hTAFII55 nicht mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne

Ein Koaktivator sollte, um das Aktivierungssignal weiterleiten zu können, die Transaktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors kontaktieren. Um zu untersuchen, ob hTAFII55, neben der c-Jun bZip Domäne, zusätzlich noch die c-Jun Transaktivierungsdomäne bindet, wurden verschiedene C-terminale Deletionsmutanten von c-Jun und v-Jun durch *in-vitro*-Translation im Retikulocytenlysat hergestellt. Deletionsmutanten des c-Jun Proteins, die aus der N-terminalen Transaktivierungsdomäne bestehen, werden in dem verwendeten System jedoch nur sehr ineffizient produziert. Sie wurden deshalb an die LexA DNA-Bindedomäne fusioniert. Dies erlaubte eine effiziente Expression der gewünschten Proteine (Abb. 19A).

Während c-Jun effizient an GST hTAFII55 bindet, zeigt keine der verwendeten Deletionsmutanten eine Interaktion (Abb. 19B, Spuren 1-18). Auch das Fusionsprotein aus der c-Jun Transaktivierungsdomäne und der DNA-Bindedomäne des heterologen Transkriptionsfaktors GHFI kann nicht mit TAFII55 interagieren (Abb. 19B, Spuren 19-20). Um auszuschließen, dass die fehlende Interaktion zwischen GST hTAFII55 und c-Jun dadurch begründet ist, dass der GST-Anteil im GST TAFII55 eine c-Jun Interaktionsfläche sterisch hindert, wurde das reziproke Experiment durchgeführt. GST, bzw. GST-Fusionen der gesamten c-Jun Transaktivierungsdomäne (1-166) und einer verkürzten Version der c-Jun Transaktivierungsdomäne (1-78) wurden in Bakterien exprimiert und über Glutathion-Agarose affinitätsgereinigt. In Abb. 20A sind, neben c-Jun,

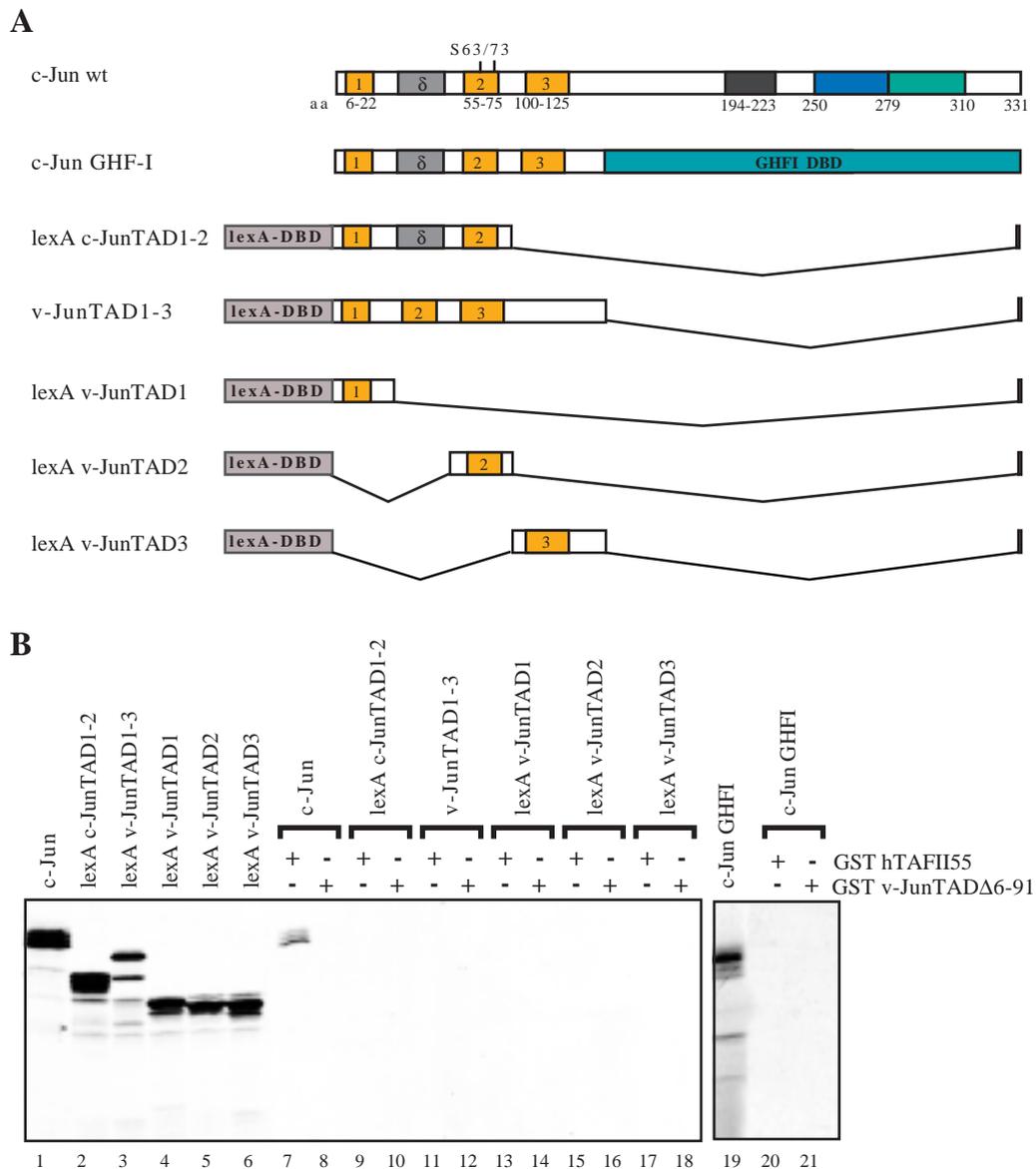


Abb. 19 *In-vitro* Interaktion zwischen der c-Jun Transaktivierungsdomäne und GST-hTAFII55.

A. Schematische Darstellung der verwendeten c-Jun und v-Jun Deletionsmutanten. Die sauren Regionen der Transaktivierungsdomänen sind in gelb, die basische Region in blau und die Leucin-Zipper Region in grün dargestellt. In c-Jun GHF-I wurde die DNA-Bindedomäne von c-Jun gegen die des Transkriptionsfaktors GHF-I (türkis) ausgetauscht. Einige Konstrukte enthalten zur Stabilisierung die DNA-Bindedomäne des LexA Proteins. **B.** „Pulldown-Experiment“ mit GST hTAFII55 oder GST v-JunTADΔ6-91 und den angegebenen Jun-Proteinen. c-Jun und die diversen LexA-Jun Fusionen bzw. c-Jun GHF-I wurden durch *in-vitro*-Translation im Retikulozytenlysat hergestellt und radioaktiv markiert. Die präzipitierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden ebenfalls je 1/5 der Menge der eingesetzten Jun-Proteine aufgetrennt.

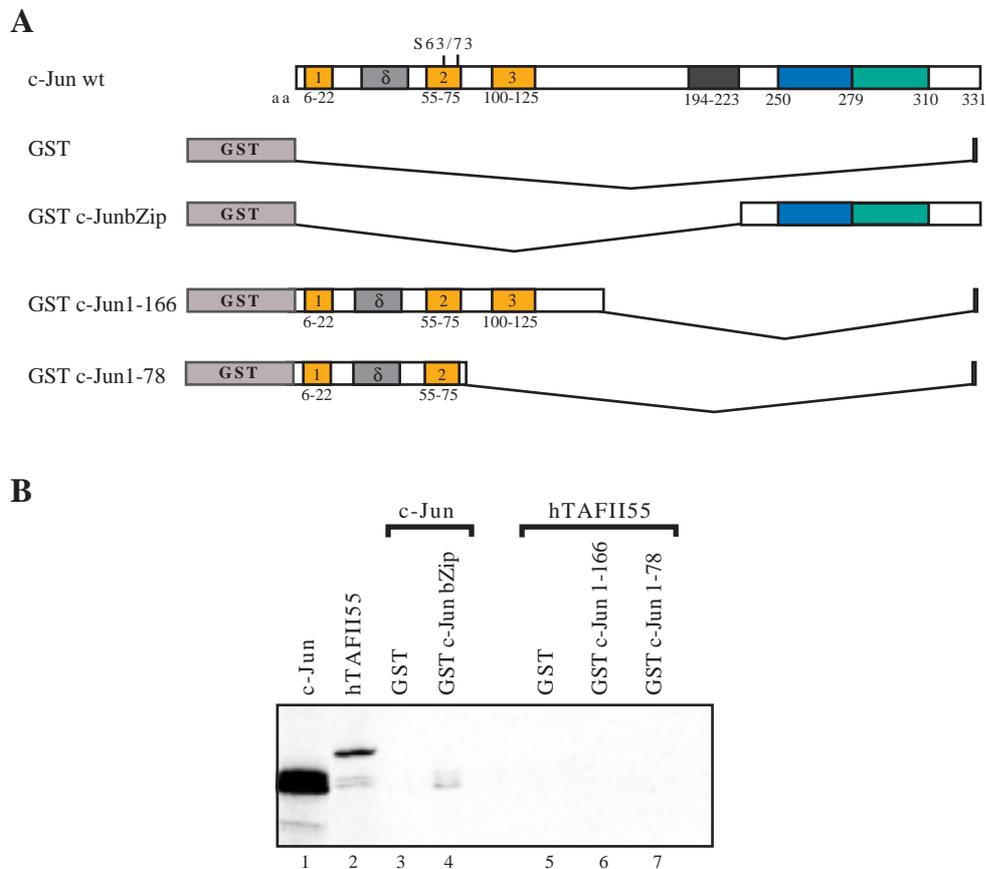


Abb. 20 *In-vitro* Interaktion zwischen hTAFII55 und der an GST fusionierten c-Jun Transaktivierungsdomäne.

A. Schematische Darstellung der GST c-Jun Fusionsproteine. Die sauren Regionen der c-Jun Transaktivierungsdomäne werden durch gelbe Boxen, die basische Region durch eine blaue Box und die Leucin-Zipper Region durch eine grüne Box dargestellt. **B.** Die Proteine GST, GST c-Jun bZip, GST c-Jun 1-166 und GST c-Jun 1-78 wurden in *E.coli* überexprimiert und gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden im „GST-Pulldown“ mit hTAFII55 und zur Kontrolle der Reaktionsbedingungen mit c-Jun eingesetzt. c-Jun und hTAFII55 wurden durch *in-vitro* Translation im Retikulocytenlysat hergestellt und radioaktiv markiert. 1/5 der eingesetzten radioaktiv markierten Proteine und das gesamte Präzipitat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt eine Autoradiografie durchgeführt.

die GST-Fusionskonstrukte schematisch dargestellt. hTAFII55 wurde durch *in-vitro* Translation im Retikulocytenlysat hergestellt. Die GST-Fusionsproteine und hTAFII55 wurden zusammen mit einer Glutathion-Matrix inkubiert. hTAFII55 bindet weder an GST c-Jun1-166 noch an GST c-Jun1-78 (Abb. 20B, Spuren 2, 5-7). Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Präzipitation von c-Jun unter diesen Bedingungen wurde die Interaktion zwischen GST c-Jun bZip und c-Jun, welches durch *in-vitro*-Translation hergestellt wurde, nachgewiesen (Abb. 20B, Spuren 1, 3, 4). Somit vermag rekombinantes hTAFII55 *in-vitro* weder mit der v-Jun noch mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne zu interagieren.

5.3.7 *In-vivo* bindet hTAFII55 an die Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins

Im c-Jun Protein besitzt ausschließlich der N-terminale Bereich das Potential RNA-Polymerase II abhängige Transkription zu stimulieren (Bohmann und Tjian, 1989). Demzufolge müsste ein assoziierter Koaktivator die Transaktivierungsdomäne des Jun-Proteins kontaktieren, damit er das Signal weiterleiten kann. *In-vitro* konnte jedoch keine Interaktion der c-Jun Transaktivierungsdomäne mit hTAFII55 nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte eine indirekte Interaktion zwischen hTAFII55 und dem c-Jun N-Terminus in der Zelle sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden GST, bzw. GST-Fusionen mit der c-Jun bZip-Domäne, der gesamten c-Jun Transaktivierungsdomäne (1-166) und einer verkürzten Version der c-Jun Transaktivierungsdomäne (1-78) in Bakterien exprimiert und über Glutathion-Agarose affinitätsgereinigt (Schematische Darstellung der Konstrukte in Abb. 21A). Die gereinigten Proteine wurden in einem „GST-Pulldown“-Experiment auf Interaktion mit hTAFII55 getestet, welches in HEK293 Zellen überexprimiert wurde. Die Menge an kopräzipitiertem hTAFII55 wurde durch Westernblot-Analyse nachgewiesen. hTAFII55 interagiert nicht mit dem GST-Protein selbst, jedoch kann es effizient mit GST c-Jun bZip präzipitiert werden (Abb. 21B, Spuren 1 und 2) . Mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne (c-Jun1-166) kann unter diesen Bedingungen ebenfalls eine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 21B, Spur 3). Im Vergleich zur gesamten c-Jun Transaktivierungsdomäne bindet hTAFII55 jedoch deutlich schwächer an GST c-Jun1-78. Das Experiment weist darauf hin, dass hTAFII55 in Anwesenheit weiterer Faktoren, nicht nur an die c-Jun bZip Domäne, sondern auch mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne interagieren kann.

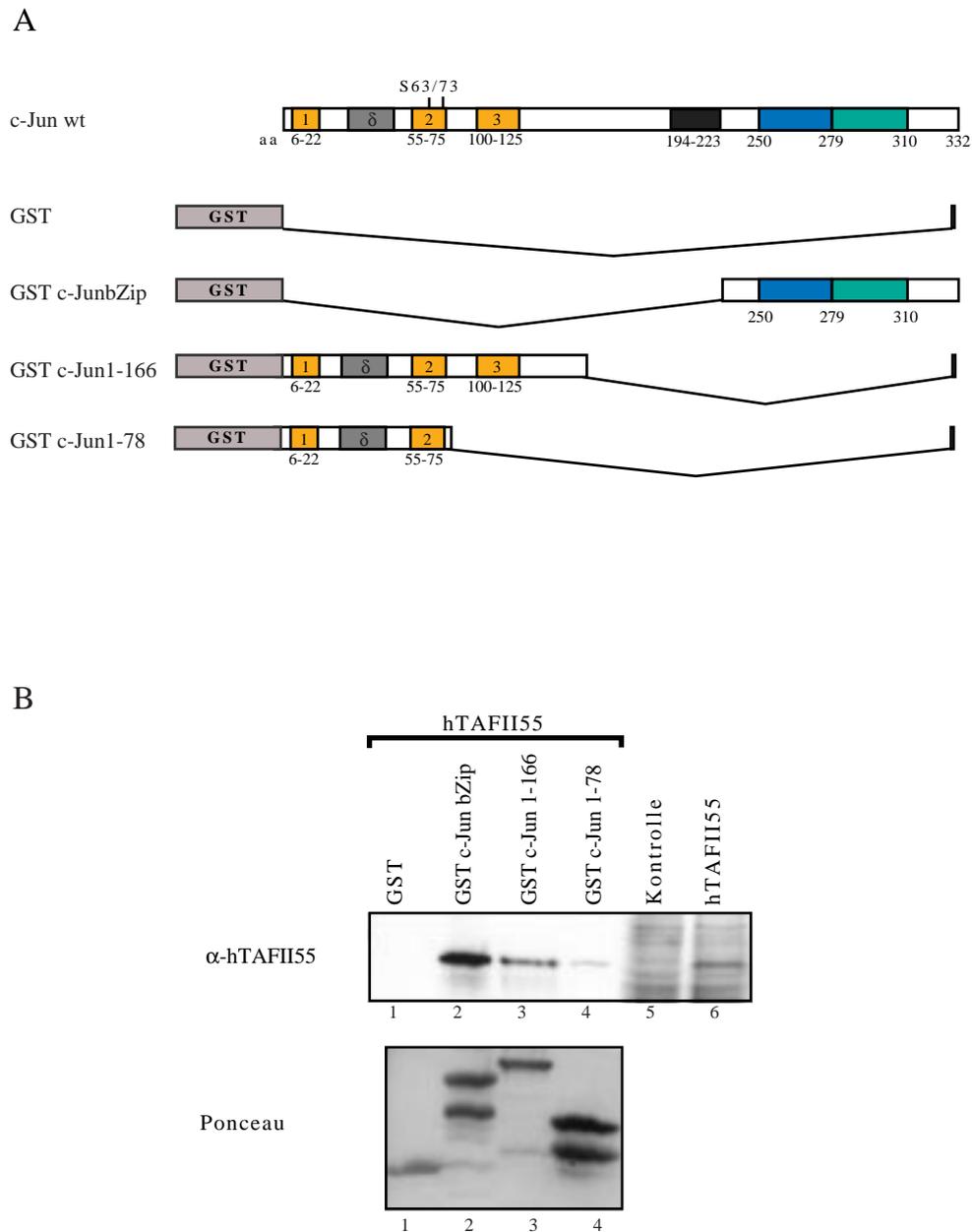


Abb. 21 In-vivo interagiert hTAFII55 mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne.

A. Schematische Darstellung der verwendeten GST-c-Jun Fusionsproteine. Zum Vergleich wird das c-Jun Protein selbst gezeigt. Die sauren Regionen der c-Jun Transaktivierungsdomäne werden durch gelbe Boxen, die basische Region durch eine blaue Box und die Leucin-Zipper Region durch eine grüne Box dargestellt. B. Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* überexprimiert und gereinigt. Der Expressionsvektor RSV hTAFII55 wurde in HEK293 Zellen transfiziert, die Zellen nach 36 h geerntet (Spur 6), und Proteinextrakte präpariert. Der Dieser wurde mit den angegebenen GST-Fusionsproteinen im „GST-Pulldown“ eingesetzt. 1/10 der Menge des eingesetzten Proteinextrakts und dieselbe Menge eines Proteinextrakts, der aus untransformierten Zellen stammt, wurden zusammen mit den präzipitierten Proteinen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des hTAFII55- spezifischen Antikörpers (19TA Lavigne et al., 1996) eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Die GST-Fusionsproteine wurden durch Ponceau-Färbung sichtbar gemacht.

5.3.8 hTAFII55 erkennt zwei Interaktionsflächen in der c-Jun Transaktivierungsdomäne

Um die hTAFII55-Interaktionsfläche in der c-Jun Transaktivierungsdomäne zu charakterisieren wurden GST Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und gereinigt, die sich durch N-terminale, graduelle Deletion der Jun Transaktivierungsdomäne auszeichnen (schematische Darstellung in Abb. 22A). Die gereinigten Proteine wurden auf Interaktion mit hTAFII55 getestet. HEK293 Zellen wurden hierfür mit dem Expressionsvektor RSV-hTAFII55 transient transfiziert und Proteinextrakte präpariert. Der Proteinextrakt aus hTAFII55 transfizierten HEK293 Zellen enthält deutlich mehr hTAFII55 als solcher, der aus Zellen gewonnen wurde, welche mit dem Kontroll-Expressionsvektor transfiziert wurden (Abb. 22B, Spuren 1 und 2). GST v-JunTAD Δ 6-12 zeichnet sich durch die Deletion der ersten sauren Domäne und im Vergleich zu c-Jun der δ Region aus. Dennoch kann eine deutliche Interaktion mit hTAFII55 beobachtet werden (Abb. 22B, Spuren 4 und 5). Die zusätzliche Deletion der zweiten sauren Domäne (v-Jun Δ 6-58) zeigt ebenfalls keinen Einfluss (Abb. 22B, Spur 6). hTAFII55 vermag jedoch nicht an das Fusionsprotein GST v-Jun Δ 6-91 zu binden (Abb. 22B, Spur 7). Die vollständige Deletion aller drei sauren Domänen in der Jun Transaktivierungsdomäne hat auch einen vollständigen Verlust der Interaktion mit hTAFII55 zur Folge. Diese Befunde weisen, zusammen mit den in Abb. 22 gezeigten Daten darauf hin, dass hTAFII55 zwei Regionen in der Transaktivierungsdomäne von c-Jun kontaktiert.

5.3.9 Die c-Jun bZip Domäne ist für eine effiziente c-Jun Aktivierung durch hTAFII55 erforderlich

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl die c-Jun Transaktivierungsdomäne als auch die bZip Domäne unabhängig voneinander mit hTAFII55 interagieren. Es stellt sich die Frage, ob die Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins ausreichend ist, um durch hTAFII55-Überexpression eine weitere Erhöhung der c-Jun Aktivität zu erreichen. Fusionen aus der Gal4-DBD (DNA Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 aus *S.cerevisiae*) und der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins (Gal4 c-Jun) bzw. des heterologen Transkriptionsfaktors GHFI (GHFI Gal4) wurden in HEK293 Zellen überexprimiert. Deren Transaktivierungspotential wurde bei steigenden hTAFII55 Mengen mit Hilfe des Gal4 abhängigen Gal4-CAT Reporters

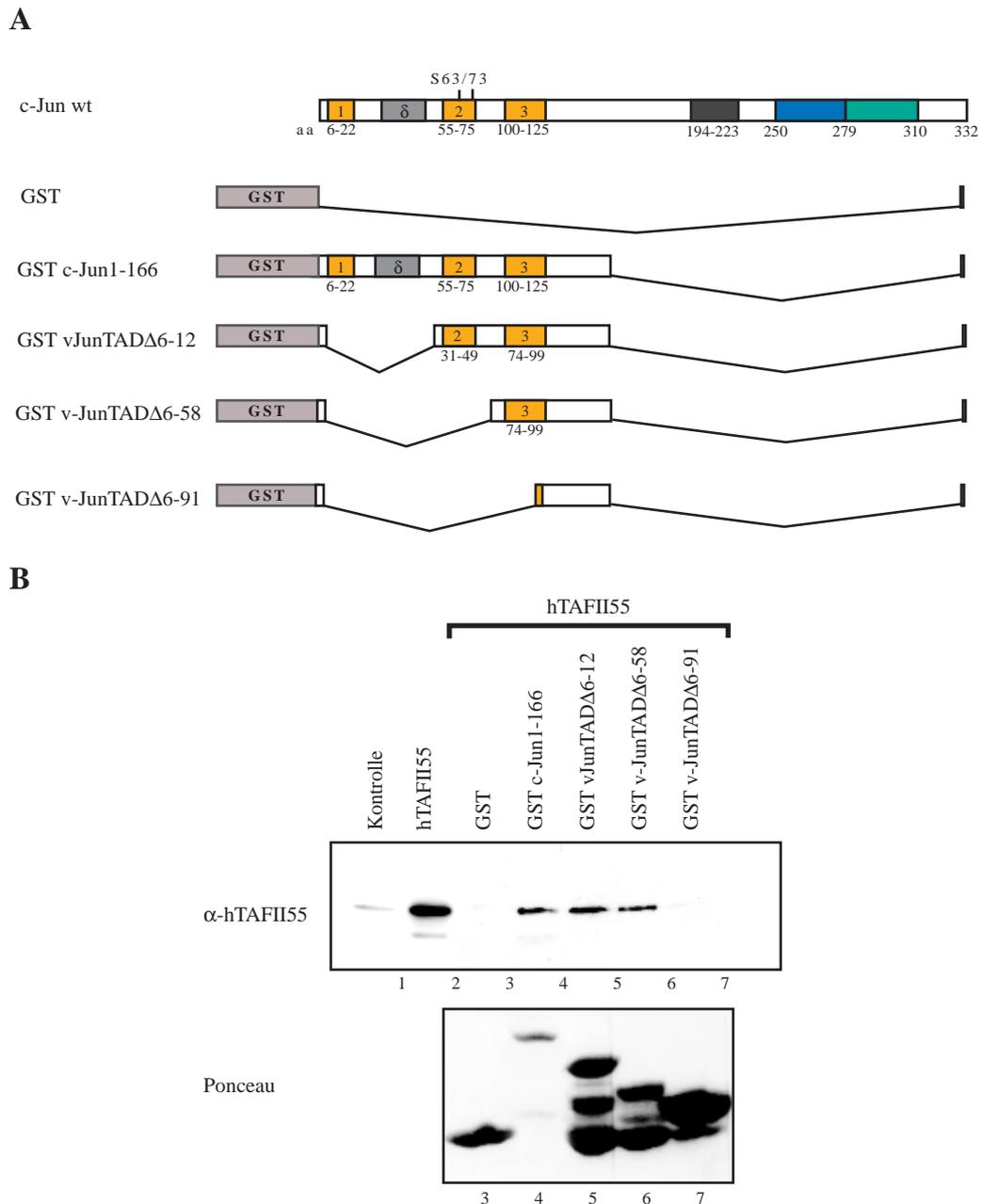
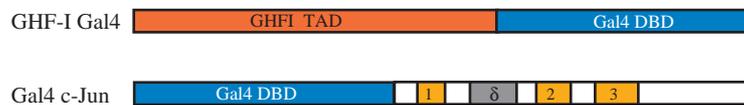


Abb. 22 hTAFII55 interagiert mit zwei verschiedenen Regionen in der c-Jun Transaktivierungsdomäne.

A. Schematische Darstellung der verwendeten GST c-Jun Fusionsproteine. Die sauren Regionen der Transaktivierungsdomänen sind in gelb, die basische Region in blau und die Leucin-Zipper Region in grün abgebildet. **B.** Die angegebenen GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* überexprimiert und gereinigt. HEK 293 Zellen wurden mit dem für hTAFII55 kodierenden Expressionplasmid oder dem Kontrollplasmid transfiziert, die Zellen nach 36 h geerntet und Proteinextrakte präpariert. Diese wurden im „GST-Pulldown“ wie dargestellt mit den verschiedenen GST Fusionsproteinen eingesetzt. 1/3 der im Experiment verwendeten Menge an Proteinextrakt und die gesamte Menge der präzipitierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine „Western-Blot Analyse“ durchgeführt. Es wurde der hTAFII55 spezifische Antikörper 19TA (Lavigne et al., 1996) verwendet. Die GST Fusionsproteine wurden mit Ponceau angefärbt.

A



B

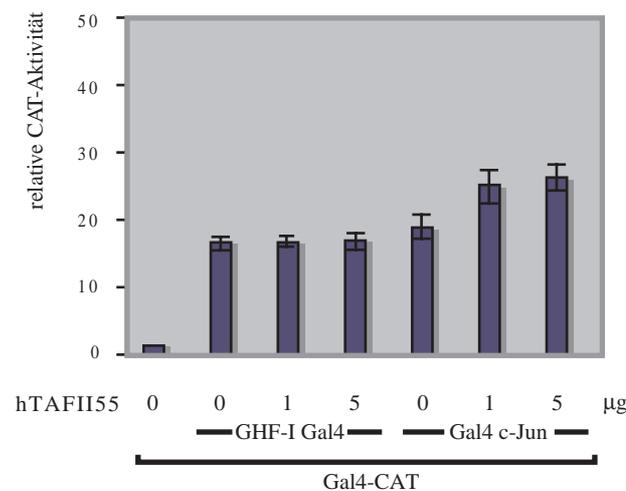


Abb. 23 Die c-Jun bZip Domäne ist für eine effiziente c-Jun Aktivierung durch hTAFII55 erforderlich.

A. Schematische Darstellung der Gal4 Fusionsproteine. **B.** Je 4 µg der für GHF-I Gal4 oder Gal4 c-Jun kodierenden Expressionsplasmide wurden zusammen mit den angegebenen Mengen des Expressionsplasmides RSV hTAFII55 in HEK293 Zellen transfiziert. Als Reportergen wurde jeweils 5 µg Gal4-CAT verwendet. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Proteinextrakte präpariert und eine CAT-Aktivitätsanalyse durchgeführt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind grafisch dargestellt.

bestimmt (Abb. 23). Die basale Aktivität des Gal4-CAT Reporters wurde in Anwesenheit der Gal4 DBD gemessen. Expression von GHFI Gal4 bzw. Gal4 c-Jun führt zu stark erhöhter CAT Aktivität. Dies zeigt, dass die Transaktivierungsdomänen beider Fusionsproteine in HEK293 Zellen funktionell sind. Überexpression von hTAFII55 zeigt jedoch keinen Einfluss auf das GHFI-Gal4 Transaktivierungspotential. Hingegen kann die Aktivität von Gal4 c-Jun durch erhöhte Mengen hTAFII55 um ca. 30 % gesteigert werden.

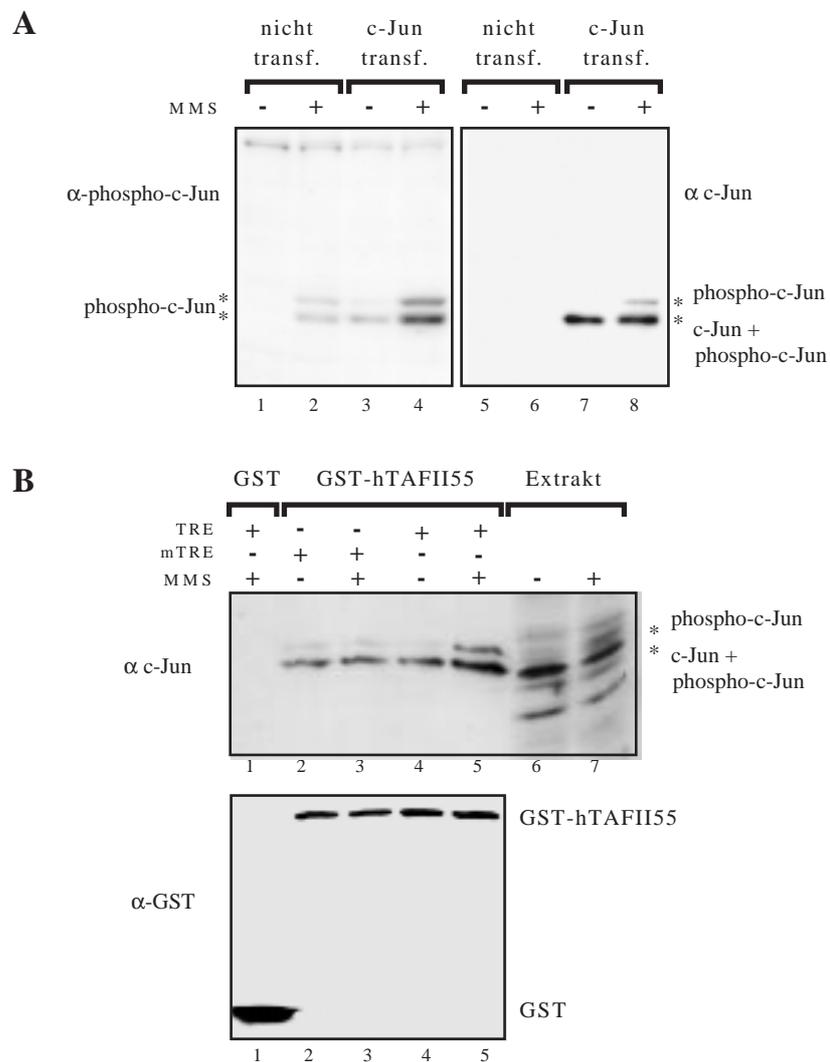


Abb. 24 In-vivo interagiert hTAFII55 präferentiell mit phosphoryliertem, DNA gebundenem c-Jun.

A. Proteinextrakte aus untransfizierten oder RSV c-Jun transfizierten und MMS behandelten oder unbehandelten HEK293 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot Analyse unterzogen. Es wurden die angegebenen Antikörper verwendet. α -phospho-c-Jun erkennt c-Jun, welches an Serin 63 phosphoryliert ist (New England Biolabs). α c-Jun erkennt das c-Jun Protein unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus (Transduction Laboratories). Die Proteinkonzentrationen in den Proteinextrakten wurden mit Hilfe des Lowry-Tests bestimmt. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen und der Auftrag durch Ponceau-Färbung nachgeprüft. **B.** GST hTAFII55 und GST wurden in *E.coli* überexprimiert und gereinigt. HEK293 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor RSV c-Jun transfiziert und ein Teil der Zellen mit MMS behandelt. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte präpariert. Diese konnten im „GST-Pulldown“ mit GST hTAFII55 und zur Kontrolle mit GST eingesetzt werden. 1/3 der Menge der eingesetzten Extrakte und die gesamte Menge der präzipitierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot Analyse durchgeführt. GST und GST hTAFII55 wurden durch Ponceau-Färbung sichtbar gemacht.

Zum Vergleich führt die Überexpression von hTAFII55 zu einer Erhöhung des c-Jun Transaktivierungspotentials um ca. 400 % (Abb. 14). Die Wirkung der hTAFII55-Überexpression auf Gal4 c-Jun ist im Vergleich zum c-Jun wt Protein somit deutlich vermindert, was vermuten lässt, dass in diesem Prozess neben der c-Jun TAD auch die c-Jun bZip Domäne eine Rolle spielen könnte.

5.3.10 In vivo interagiert hTAFII55 präferentiell mit phosphoryliertem, DNA gebundenem c-Jun

Die Aktivität der c-Jun Transaktivierungsdomäne wird durch Phosphorylierung an Ser 63/73 reguliert. Dies wird von Kinasen der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Familie, den JNK/SAPK (Jun N-terminal protein kinase / stress-activated protein kinase), bewerkstelligt (Gupta et al., 1996; Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1994; Derijard et al., 1994). Einer der stärksten Induktoren der Phosphorylierung von c-Jun an Position Ser63/73 ist das alkylierende Agens MMS (Wilhelm et al., 1997). Proteinextrakte aus MMS behandelten HEK293 Zellen, wurden einer Westernblot-Analyse unterzogen. Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch c-Jun, das an Position Ser63 ein Phosphat trägt. In Extrakten aus untransfizierten HEK293 Zellen erkennt dieser Antikörper nach MMS Behandlung, zwei phosphorylierte c-Jun Formen, die in unbehandelten Zellen nicht zu finden sind (Abb. 24 A, Spur 1,2). Dies sind das an Ser63 einfach phosphorylierte und das an Ser63/73 doppelt phosphorylierte c-Jun. Die Transfektionsprozedur ist für Zellen stressauslösend. Daher kann nach Transfektion der HEK293 Zellen mit dem RSV c-Jun Expressionsvektor eine signifikante Phosphorylierung des c-Jun Proteins beobachtet werden (Abb. 24 A, Spur 3; Hagemeyer et al., 1993). Durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit MMS wird die Menge des phosphorylierten c-Juns um ein Vielfaches erhöht (Abb. 24 A, Spur 4). Um die c-Jun Gesamtmengen vergleichen zu können wurde eine Westernblot-Analyse, unter Verwendung eines Antikörper der c-Jun unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt, durchgeführt. Die Menge des c-Jun Proteins bleibt in transfizierten Zellen nach MMS-Behandlung unverändert (Abb. 24 A, Spuren 3 und 4). In Proteinextrakten aus MMS behandelten Zellen erkennt man zusätzlich zur c-Jun Hauptbande ein weiteres Signal, welches phosphoryliertes c-Jun darstellt (Abb. 24 A, Spur 8; Abb. 24 B, Spur 7). Um die Frage zu beantworten, ob der Phosphorylierungsstatus des c-Jun Proteins die Interaktion mit hTAFII55 beeinflusst, wurden Proteinextrakte aus c-

Jun transfizierten, unbehandelten Zellen im „GST-Pulldown“, unter Verwendung von GST hTAFII55, eingesetzt. In Anwesenheit der mutanten Form des TRE-Oligonucleotides interagiert c-Jun mit hTAFII55. Das gleiche Bild ergibt sich jedoch auch, wenn Proteinextrakt aus MMS behandelten Zellen eingesetzt wird (Abb. 24B, Spur3). Unter den gewählten Bedingungen führt die Phosphorylierung des c-Jun Proteins nicht zu einer Verstärkung der Interaktion mit hTAFII55. Auch wird nicht bevorzugt phosphoryliertes c-Jun durch GST-hTAFII55 präzipitiert.

c-Jun, das zur Klasse der Sequenz-spezifischen Transaktivatoren gezählt wird, muss, um einen RNA-Polymerase II abhängigen Promotor aktivieren zu können, spezifisch an DNA gebunden sein (Angel et al., 1988; Bohmann et al., 1987). Daher muss die DNA-gebundene Form des c-Jun Proteins das eigentliche Ziel von hTAFII55 sein. Hingegen zeigen die vorliegenden Daten dass die Interaktion zwischen der c-Jun bZip Domäne und hTAFII55 *in-vitro* durch die Bindung von c-Jun an DNA inhibiert wird. Da hTAFII55 jedoch *in-vivo* auch mit der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins interagieren kann, könnte der Verlust der Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip Domäne durch die Interaktion mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne kompensiert werden. Es sollte deshalb überprüft werden, ob DNA-gebundenes c-Jun, das in HEK293-Zellen überexprimiert wurde, in Anwesenheit von Proteinextrakt hTAFII55 binden kann. Tatsächlich bleibt in diesem Fall die Interaktion zwischen hTAFII55 und c-Jun, auch nach der Bindung von c-Jun an DNA, erhalten (Abb. 24B, Spuren 2 und 4). Wird Proteinextrakt aus MMS-behandelten Zellen eingesetzt, kann weiterhin beobachtet werden, dass nach Zugabe des funktionellen TRE, besonders die phosphorylierte Form des c-Jun Proteins verstärkt an GST hTAFII55 bindet (Abb. 24B, Spur 5). Aus den vorliegenden Befunden kann geschlossen werden, dass die in der Transaktivierungsdomäne hyperphosphorylierte, DNA-gebundene Form des c-Jun Proteins *in-vivo* das bevorzugte Ziel von hTAFII55 darstellt

6. DISKUSSION

6.1 Die Rolle des SAGA-Komplexes in der v-Jun vermittelten Aktivierung der Transkription

Transaktivatoren mit sauren Transaktivierungsdomänen wie z.B. VP16, GCN4, Gal4 und die Proteine der Jun Familie, haben die Besonderheit, dass sie in der Lage sind sowohl in *S.cerevisiae* als auch in höheren Vertebratenzellen RNA-Polymerase II abhängige Transkription zu aktivieren (Struhl, 1988; Kelleher et al., 1992). In *S.cerevisiae* wird ein Teil des Transaktivierungspotentials der sauren Transaktivatoren VP16 und GCN4 über die Interaktion mit dem SAGA-Komplex vermittelt (Ikeda et al., 1999; Vignali et al., 2000; Dudley et al., 1999). *In-vitro*- und *in-vivo*-Kompetitionsexperimente lassen den Schluss zu, dass Transkriptionsfaktoren, die zur Klasse der sauren Transaktivatoren gehören, RNA-Polymerase II abhängige Transkription über einen gemeinsamen Mechanismus aktivieren (Tasset et al., 1990, Oehler und Angel, 1992;).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob auch Jun-abhängige Transaktivierung durch den SAGA-Komplex vermittelt wird. Hierfür wurde die Aktivität der v-Jun Transaktivierungsdomäne in *S.cerevisiae*-Stämmen, in denen Gene für verschiedene Untereinheiten des SAGA-Komplexes deletiert wurden, bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass v-Jun, im Gegensatz zu VP16, Gal4 oder GCN4, Transkription unabhängig vom SAGA-Komplex aktiviert. Weder die HAT-Aktivität des SAGA-Komplexes, noch seine Interaktion mit TBP ist für die Aktivität des v-Jun Proteins notwendig. Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der sauren Proteine VP16, GCN4 und Gal4 beeinträchtigt wenn auch nur eine der Funktionen des SAGA-Komplexes eliminiert wird. Obwohl es einen oder mehrere konservierte Mechanismen geben muss, über den oder die saure Transaktivatoren wirken, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die einzelnen Transaktivierungswege nicht von allen Mitgliedern dieser Klasse genutzt werden. In *S.cerevisiae* sind neben dem SAGA-Komplex noch drei weitere Proteinkomplexe mit

HAT-Aktivität bekannt: ADA, NuA4 und NuA3 (Grant et al., 1997). Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in der Spezifität mit der sie Transaktivierungsdomänen kontaktieren oder Histone acetylieren. Der ADA-Komplex setzt sich aus Komponenten zusammen, die auch im SAGA-Komplex zu finden sind. Er enthält aber auch mindestens eine spezifische Komponente, das Produkt des AHC1-Gens, die in SAGA nicht zu finden ist (Eberharter et al., 1999). Für die Funktion des ADA-Komplexes ist seine katalytische Untereinheit GCN5 essentiell. Diese ist jedoch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, für die Transaktivierung durch v-Jun nicht notwendig. Daher kann ausgeschlossen werden, dass der ADA-Komplex in der Jun-abhängigen Transaktivierung eine Rolle spielt. SAGA, ADA und NuA3 acetylieren hauptsächlich Histon H3 (Grant et al., 1997). Der NuA4 Komplex acetyliert hingegen primär Histone H4 (Eberharter et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Ohba et al., 1999; Allard et al., 1999). Im Gegensatz zum SAGA-Komplex zeigt NuA4 keine besondere Spezifität für saure Transaktivierungsdomänen. Vielmehr interagiert er mit Transaktivierungsdomänen unterschiedlicher Klassen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass NuA4 bei der transkriptionellen Aktivierung durch v-Jun eine Rolle spielt. NuA3 ist der einzige bisher isolierte HAT-Komplex, dessen Aktivität nicht von GCN5 abhängt. Als katalytische Untereinheit wurde hier Sas3 (**S**omething **A**bout **S**ilencing protein 3) identifiziert (John et al., 2000). Im Unterschied zu SAGA oder ADA ist der NuA3-Komplex nicht in der Lage direkt mit der sauren Transaktivierungsdomänen zu interagieren (Ikeda et al., 1999). Auch in Zellen höherer Eukaryonten sind eine Reihe von verschiedenen HAT-Komplexen bekannt. Einer davon, der P/CAF-Komplex, bindet an p300/CBP, welches wiederum als Interaktionspartner verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch von c-Jun und c-Fos beschrieben wurde. CBP kann in transienten Transfektionsexperimenten die Aktivität der c-Jun Proteine und des c-Jun/c-Fos Heterodimers stimulieren (Arias et al., 1994; Bannister und Kouzarides, 1995; Bannister et al., 1995; Lee et al., 1996). CBP/p300 kann, da es eigene HAT-Aktivität besitzt, unabhängig von P/CAF alle vier Core-Histone in Nucleosomen acetylieren und dadurch die Transkription stimulieren (Ogryzko et al., 1996).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen AP-1 abhängiger Transaktivierung und Histonacetylierung wurde vor kurzem nachgewiesen. Es wurde beschrieben, dass ATF-2, eine Komponente von AP-1, in der Lage ist selbständig Histon H2B und H4 zu acetylieren (Kawasaki et al., 2000). ATF-2 kann in Form von Heterodimeren zusammen mit c-Jun an

AP-1 Konsensus-Sequenzen binden und Transkription aktivieren (Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991; van Dam et al., 1993; Chatton et al., 1994; Herr et al., 1994). Obwohl für die Transaktivierung durch v-Jun in *S.cerevisiae* der SAGA-Komplex nicht benötigt wird, ist es denkbar, dass Jun-Proteine in Zellen höherer Eukaryonten Transkription aktivieren, indem sie mit Proteinen mit HAT-Aktivität interagieren oder HAT-Komplexe rekrutieren.

6.2 Isolierung von Interaktionspartnern der v-Jun Transaktivierungsdomäne

6.2.1 Im Vergleich zu den sauren Regionen 1 und 3 der v-Jun Transaktivierungsdomäne zeigt Region 2 in *S.cerevisiae* die schwächste Aktivität

Um Koaktivatoren zu isolieren, die mit der Transaktivierungsdomäne des v-Jun Proteins interagieren, wurde ein klassischer „two-hybrid screen“ nach Gyuris et al. (1993) durchgeführt. Zunächst sollten durch eine Deletionsanalyse der v-Jun Transaktivierungsdomäne diejenigen Regionen identifiziert werden, deren Aktivität gering genug ist, um sie im „two-hybrid screen“ als „bait“-Proteine zu verwenden. Die einzelnen sauren Regionen der v-Jun Transaktivierungsdomäne (TAD) wurden daher als artifizielle LexA-Fusionen in *S.cerevisiae* exprimiert und deren Aktivität bestimmt (zur Übersicht Abb. 25).

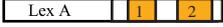
		Aktivitäten		
		<i>S.cerevisiae</i>	<i>F9</i>	<i>S.cerevisiae</i> (Gal4-Fusionen)
Lex A v-Jun TAD 1-3		100	100	100
Lex A v-Jun TAD 2-3		60	50	78
Lex A v-Jun TAD 1-2		6,5		
Lex A v-Jun TAD 1		2		
Lex A v-Jun TAD 2		1		
Lex A v-Jun TAD 3		4	3	30

Abb. 25 Übersicht der Aktivitäten der einzelnen sauren Regionen der v-Jun Transaktivierungsdomäne

Die LexA v-JunTAD Fusionskonstrukte sind schematisch dargestellt. Die sauren Regionen sind in gelb abgebildet. Die Aktivitäten von LexA v-JunTAD1-3 wurde auf 100% gesetzt; die Aktivitäten der restlichen Fusionsproteine wurden relativ zu LexA v-JunTAD1-3 angegeben. Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der analogen Gal4-Konstrukte in *F9-Zellen* und *S.cerevisiae* angegeben (Struhl, 1988; Angel, 1989).

Die Analyse der TAD-Einzelaktivitäten zeigte, dass die saure Region 3 des v-Jun Proteins (TAD3; aa 68-120) in *S.cerevisiae* die stärkste Aktivität besitzt. Die saure Region 1 (TAD1, aa 1-34) lässt eine deutliche Aktivität erkennen. Sie ist jedoch um die Hälfte geringer, als die der Region 3. Region 2 (TAD2, aa 35-67) zeigt nur sehr schwache Aktivität, die nicht ausreicht um in Anwesenheit eines LexA-abhängigen *leu2*-Reportergens Wachstum auf Leucin-freiem Medium zu vermitteln und ist daher ein ideales „bait“-Protein für den „two-hybrid screen“. Kombinationen der drei sauren Region demonstrieren, dass die Aktivität der Regionen 1 und 2 additiv ist, während die der Regionen 2 und 3 synergistisch ist. Die synergistische Wirkung der Regionen 2 und 3 könnte dadurch erklärt werden, dass die Transaktivierungsdomäne nur dann richtig gefaltet ist, wenn sie zumindest aus Region 2 und 3 besteht. Eine weitere Erklärung wäre, dass die einzelnen sauren Regionen verschiedene Koaktivatoren binden und dadurch Transkription auf mehreren Wegen parallel aktivieren können. Es ist aber auch denkbar, dass die drei sauren Regionen mit verschiedenen Komponenten eines Koaktivatorkomplexes interagieren und aufgrund dessen den Komplex stabilisieren. Vergleicht man die Aktivitäten der LexA v-Jun Fusionsproteine mit den Aktivitäten von Fusionen aus der Gal4 DNA-Bindedomäne (DBD) und der v-Jun Transaktivierungsdomäne, (Struhl, 1988; Angel et al., 1989), zeigt sich, dass sich die Gal4 v-Jun Fusionen in F9-Zellen ähnlich den LexA v-Jun Fusionen in *S.cerevisiae* verhalten. Hingegen scheint in *S.cerevisiae* die Transaktivierungsregion 3 von v-Jun, wenn sie an die Gal4 DBD fusioniert wurde, eine höhere Aktivität zu besitzen als die analoge LexA-Fusion (Struhl et al., 1988). Es bieten sich zwei Erklärungen für diese Beobachtung an. (1) In den beschriebenen Ansätzen wurden verschiedene *S.cerevisiae*-Stämme verwendet, in denen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie möglicherweise unterschiedlich exprimiert werden. (2) Die Aktivitätsunterschiede könnten schon durch die Verwendung der unterschiedlichen DNA-Bindedomänen erklärt werden. Die Gal4 DBD wurde C-terminal, die LexA DBD N-terminal an die v-Jun Transaktivierungsdomäne fusioniert. Es könnten somit strukturelle Einflüsse der DNA-Bindedomänen auf die Transaktivierungsdomäne vorliegen, die sich auf die Aktivität der Fusionsproteine auswirken.

6.2.2 Isolierung von PAG und NKEF-B im „two-hybrid screen“ als Interaktionspartner der v-Jun Transaktivierungsdomäne

Der „two-hybrid screen“ wurde mit dem LexA v-JunTAD2 Fusionsprotein als „bait“-Protein durchgeführt. Die möglichen Interaktionspartner wurden von einer HeLa-cDNA Bank, welche an die cDNA der B42-Transaktivierungsdomäne fusioniert waren, kodiert. Als Interaktionspartner der v-Jun Transaktivierungsdomäne konnten PAG und NKEF-B isoliert werden. Beide interagieren spezifisch mit der v-Jun Transaktivierungsdomäne, jedoch nicht mit der v-Jun bZip-Domäne oder der Region 149-196 des c-Jun Proteins. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PAG und NKEF-B zwei verschiedene Regionen der v-Jun Transaktivierungsdomäne kontaktieren können. Sie interagieren sowohl mit der sauren Region 1 (aa 1-34) als auch mit der sauren Region 2 (aa 35-68). Region 1 und 2 der v-Jun Transaktivierungsdomäne weisen eine hohe Homologie zur c-Jun Transaktivierungsdomäne auf. Daher wurde untersucht, ob PAG auch an die Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins bindet. Eine Interaktion zwischen PAG und der c-Jun Transaktivierungsdomäne konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. c-Jun und v-Jun Transaktivierungsdomäne unterscheiden sich durch die Deletion der δ -Domäne im v-Jun Protein. Daher lassen die Befunde vermuten, dass die δ -Domäne die Interaktion mit PAG inhibiert. Die δ -Domäne wird für die Ubiquitinierung des c-Jun Proteins benötigt und dient als Andockstelle für die JNK (Hibi et al., 1993; Adler et al., 1995; May et al., 1998). Weiterhin wurde postuliert, dass ein Inhibitorprotein, an die δ -Domäne bindet, welches nach Phosphorylierung von c-Jun an Ser63/73 freigesetzt wird (Baichwal und Tjian, 1991; Baichwal et al., 1991; Dai et al., 1995). In *S.cerevisiae* wurde Hog1 als Homolog der JNK beschrieben (Brewster et al., 1993; Sluss et al., 1994). Bisher gibt es keine Hinweise, dass Hog1 in der Lage ist an c-Jun zu binden oder dieses zu phosphorylieren. Es könnten jedoch weitere, bisher nicht identifizierte Proteine aus *S.cerevisiae* an die δ -Domäne binden und die Interaktion von c-Jun mit PAG verhindern. Möglicherweise ist aber schon die räumliche Trennung der sauren Region 1 und 2 der c-Jun Transaktivierungsdomäne durch die δ -Domäne für die Inhibition ausreichend.

6.2.3 PAG inhibiert die Aktivität von v-Jun.

PAG und NKEF-B, die zu einer Familie von Proteinen mit Antioxidantfunktion, sogenannte Peroxiredoxine, gehören, wurden bereits mit verschiedensten zellulären Prozesse in Verbindung gebracht. Dazu zählen Zellproliferation, Zellstress, Erhöhung der Toxizität Natürlicher Killerzellen und Apoptose (Nemoto et al., 1990; Prosperi et al., 1993; Wen und Van Etten, 1997).

Die Rolle von PAG in der v-Jun und c-Jun abhängigen Transaktivierung sollte in transienten Transfektionsexperimenten in F9-Zellen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PAG zu einer Inhibition der v-Jun jedoch nicht der c-Jun Aktivität führt. Die Reduktion der Aktivität der Jun-Proteine nach Überexpression von PAG korreliert somit mit ihrer Fähigkeit mit PAG zu interagieren. Da die Überexpression eines Koaktivators, zu einer Erhöhung der Aktivität des kontaktierten Transkriptionsfaktors führen sollte, kann davon ausgegangen werden, dass PAG kein Koaktivator für die Jun Proteine darstellt. Vielmehr scheint es in Bezug auf v-Jun die Funktion eines Inhibitors auszuüben.

Die Fähigkeit von v-Jun und c-Jun DNA zu binden, ist in Anwesenheit oxidierender Agenzien reduziert, in Anwesenheit reduzierender Agenzien erhöht (Oehler et al., 1993). PAG wiederum gehört zu einer Familie von Antioxidantien, die in den Schutz der Zelle vor oxidativem Stress involviert sind (Chae et al., 1994; Sarafian et al., 1997). Um den Mechanismus zu klären, über den PAG die Aktivität des v-Jun Proteins reduziert, wurde deshalb sein Einfluss auf die DNA-Bindefähigkeit von v-Jun und c-Jun bestimmt. Es konnten im EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) nach Zugabe von bakteriell exprimiertem GST-PAG keine Veränderung der DNA-Bindefähigkeiten der Jun Proteine festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da GST-PAG in *E.coli* überexprimiert und gereinigt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass für eine Wirkung auf die DNA-Bindefähigkeit von c- und v-Jun, Modifikation des PAG Proteins notwendig sind, die in *E.coli* nicht stattfinden. Auch könnte der GST-Anteil des verwendeten PAG-Proteins seine Funktion als Antioxidant verhindern.

Um die Region von v-Jun zu identifizieren, die für die Inhibition durch PAG essentiell ist, wurde die Aktivität des Fusionsproteins aus v-Jun Transaktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne des heterologen Transkriptionsfaktors GHF-I (v-Jun GHFI) nach Überexpression von PAG bestimmt. In transienten Transfektionsexperimenten in F9-Zellen wird die Aktivität von v-Jun GHF-I nach Überexpression von PAG effizient

gehemmt. Da v-Jun GHF-I keine Anteile der Jun DNA-Bindedomäne enthält, kann davon ausgegangen werden, dass PAG tatsächlich ausschließlich über die Transaktivierungsdomäne des v-Jun Proteins wirkt.

6.2.4 Überexpression von PAG in F9-Zellen führt zu einer erhöhten v-Jun Abbaurate

Die Bestimmung der v-Jun und c-Jun Proteinmengen nach Überexpression von PAG machen deutlich, dass die Menge des v-Jun Proteins in Anwesenheit von PAG reduziert ist. Die c-Jun Proteinmenge bleibt hingegen unbeeinflusst. Die Aktivität von v-Jun und c-Jun in An- und Abwesenheit von PAG korreliert somit mit der Menge der Jun Proteine. Die Überexpression von PAG führt folglich zu verminderten v-Jun Proteinmengen und damit auch zu einer Reduktion der beobachteten v-Jun Aktivität. Mit Hilfe des Proteasehemmers LLnL konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die reduzierten v-Jun Proteinmengen auf einer Erhöhung der Abbaurate beruhen.

Als mögliche Jun-Proteinabbauwege kommen zum einen der Proteasomenweg, zum anderen der Abbau über Calpaine in Frage. Beide Wege werden in der Zelle nachweislich benutzt um Jun-Proteine zu degradieren (Treier et al., 1994; Musti et al., 1997; Hirai et al., 1991; Carillo et al., 1994; Steff et al., 1997). Für die ubiquitinabhängige Degradation von c-Jun ist die δ -Domäne essentiell. v-Jun entkommt dem Abbau durch das Proteasom, da in v-Jun die δ -Domäne deletiert ist (Treier et al., 1994). Hingegen werden c-Jun und v-Jun durch Calpaine gleich effizient degradiert (Steff et al., 1997).

Durch die Verwendung von LLnL kann keine Unterscheidung zwischen den beiden Abbauwegen getroffen werden, da bei den eingesetzten Konzentrationen sowohl der Calpain- als auch der Proteasomenweg gehemmt werden (Vinitsky et al., 1992; Mellgren et al., 1997). Aufgrund der oben beschriebenen Notwendigkeit der δ -Domäne für die Proteasomen-abhängige Degradation der Jun Proteine, kommt jedoch zur Erklärung des v-Jun Abbaus alleine der Calpain-Weg in Frage. Interessanterweise wurde beschrieben, dass Calpaine auch in den Abbau von PAG involviert sind (Schröder et al., 1998).

Innerhalb der Familie von Proteinen mit Antioxidantfunktion, zu der auch PAG gehört, ist besonders ein Cysteinrest im N-Terminus konserviert, der sich in PAG an Position 52 befindet. Für die Funktion als Antioxidant ist dieser Cysteinrest essentiell (Chae et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation des

Cys52 zu Ser, aber auch die Deletion der gesamten N-terminalen Domäne bis Aminosäure 127 die Fähigkeit des PAG Proteins den v-Jun Abbau zu stimulieren nicht beeinflusst. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von PAG auf v-Jun von seiner Funktion als Antioxidant unabhängig ist.

PAG wurde bereits als Interaktionspartner und Inhibitor des c-Abl Proteins beschrieben. Die Inhibition erfolgt hier hauptsächlich über die direkte Inaktivierung der Kinaseaktivität von c-Abl. Jedoch wurde auch beschrieben, dass die Überexpression von PAG zu reduzierten c-Abl Proteinmengen führt (Wen und Van Etten, 1997). Die Erhöhung von Abbauraten bestimmter, von PAG kontaktierter Proteine, könnte einen allgemeinen Mechanismus darstellen, über den es als Inhibitor wirkt.

c-Jun und v-Jun besitzen ein sogenanntes PPY-Motiv, das sich zwischen Transaktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne befindet. Interessanterweise vermag c-Abl das c-Jun Protein, jedoch nicht das v-Jun Protein im PPY-Motiv zu phosphorylieren (eigene, nicht gezeigte Daten). Es besteht die Möglichkeit, dass PAG an die v-Jun Transaktivierungsdomäne bindet um so eine Phosphorylierung durch c-Abl zu verhindern. NKEF-B weist eine 98%ige Homologie zu PAG auf. In allen durchgeführten Experimenten verhielt sich NKEF-B wie PAG (Daten nicht gezeigt). Es konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass PAG oder NKEF-B Koaktivator-Funktion besitzen könnten. Weitere Jun-spezifische Interaktionspartner konnten im durchgeführten „two-hybrid screen“ nicht isoliert werden. Mit Hilfe dieser Methode war es folglich nicht möglich Koaktivatoren der Jun Proteine zu identifizieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass eine Überexpression des v-Jun kontaktierenden Koaktivators in *S.cerevisiae* letal ist. Da das verwendete „bait“-Protein LexA v-JunTAD2 eine nur sehr geringe transkriptionelle Aktivität aufweist, bietet sich als Erklärung auch die Konkurrenz des HeLA-cDNA-Bank exprimierten Koaktivators durch endogene, starke Transaktivatoren an.

6.3 Die Rolle von hTAFII55 in der c-Jun abhängigen Aktivierung der Transkription

hTAFII55 interagiert mit Transkriptionsfaktoren der verschiedensten Klassen. Darunter die Transkriptionsfaktoren Sp-1, der VDR (**Vitamin D3 Rezeptor**) der TR α (**Thyroid-Hormon Rezeptor**), aber auch mit YY1 (Chiang und Roeder, 1995; Lavigne et al., 1999; Austen et al., 1997). YY1 zeichnet sich, wie auch die Jun Proteine, durch Anhäufungen saurer Aminosäuren in der Transaktivierungsregion aus. Kürzlich konnte auch eine Interaktion von E.coli exprimiertem GST-c-Jun mit hTAFII55, welches in Insektenzellen mit Hilfe des Bacculo-Virus-Systems exprimiert wurde, nachgewiesen werden (Alex Pintzas, unveröffentlichte Daten). Es lag daher nahe zu untersuchen, ob hTAFII55 zur Transaktivierung durch c-Jun beitragen kann.

6.3.1 hTAFII55 stimuliert c-Jun vermittelte transkriptionelle Aktivierung und interagiert mit der c-Jun DNA-Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne

In der vorliegenden Arbeit konnte in transienten Transfektionsexperimenten dargelegt werden, dass die Aktivität von c-Jun erhöht ist, wenn hTAFII55 überexprimiert wird. Die basale Aktivität des Thymidin-Kinase (TK)-Promotors bleibt hingegen unbeeinflusst. Folglich ist die Aktivierung durch hTAFII55 Überexpression spezifisch für c-Jun abhängige Transkription. Die beobachtete Aktivierung ist nicht auf erhöhte Proteinmengen zurückzuführen, da die c-Jun Proteinmengen mit steigenden hTAFII55 unverändert blieben (Daten nicht gezeigt).

TAFs (**TBP Associated Factors**) bauen zusammen mit TBP (**TATA Binding Protein**) den TFIID-Komplex auf und wurden klassischerweise als Koaktivatoren beschrieben (Dynlacht, 1991). Daher bietet sich als Erklärung der c-Jun abhängigen Transaktivierung durch hTAFII55, die Rolle von hTAFII55 als Brückenprotein von c-Jun an.

Brückenproteine kontaktieren auf der einen Seite Transaktivatoren, auf der anderen Seite Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und leiten so das Transaktivierungssignal weiter (Kaiser und Meisterernst, 1996).

Durch *in-vitro* und *in-vivo* GST-„Pull-down“-Experimente konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen hTAFII55 und c-Jun bzw. v-Jun nachgewiesen werden.

hTAFII55 kontaktiert sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins. Für die Bindung von hTAFII55 an die DNA-Bindedomäne spielt der Leucin-Zipper eine zentrale Rolle, da die Deletion dieses Bereichs des Jun Proteins zu einem Verlust der Interaktion führt. Interaktionsstudien mit einem mutanten v-Jun Protein, in dem der Leucin-Zipper gegen den des GCN4 Protein ausgetauscht wurde, zeigten, dass eine Dimerisierung von v-Jun oder das Leucin-Zipper Motiv *per se* nicht ausreichen, um von hTAFII55 erkannt zu werden. Vielmehr ist die spezifische Aminosäureabfolge des c-Jun Leucin-Zippers für die Interaktion mit hTAFII55 essentiell.

Das Grundmotiv des Leucin-Zippers wird aus einer α -Helix gebildet, die in ihrer Aminosäuresequenz an jeder siebten Position ein Leucin trägt. Dies erlaubt eine Dimerisierung der Zipper Motive. Die geladenen Aminosäuren des Zippers, die sich zwischen den Leucinen befinden, bestimmen die Spezifität der Interaktion. Während das Leucin-Zipper Grundgerüst zwischen den einzelnen bZip-Proteinen kaum Unterschiede aufweist, ist die Verteilung der geladenen Aminosäuren spezifisch für jedes bZip-Protein (Vogt und Bos 1990; Angel und Karin 1991; Karin et al., 1997). Es wäre daher interessant zu prüfen, welche Rolle die geladenen Aminosäuren in der Interaktion mit hTAFII55 spielen und ob hTAFII55 auch mit den bZip-Domänen der anderen Mitglieder der AP-1 Familie interagiert. Das Leucin-Zipper Motiv ist als Protein-Protein Interaktionsmotiv beschrieben worden, welches nicht nur die Dimerisierung der einzelnen AP-1 Mitglieder erlaubt, sondern auch als Interaktionsfläche für weitere Proteine dient. Cbfa-1 (**C**ore **B**inding **F**actor **A**lpha **1**), ein Transkriptionfaktor, der in die Differenzierung von Osteoblasten involviert ist, aktiviert zusammen mit AP-1 die Expression der Kollagenase-3. Cbfa-1 interagiert mit dem Leucin-Zipper von c-Jun und auch c-Fos. Für diese Interaktionen ist jedoch die genauen Primärsequenzen der Leucin-Zipper unerheblich (Ducy et al., 1997; Porte et al., 1999; Jochen Hess, unveröffentlichte Daten). Der aktivierte Glukokortikoid-Rezeptors (GR) kann mit der bZip-Region von c-Jun interagieren und c-Jun Homodimer vermittelte Transaktivierung stimulieren. Beide Prozesse sind abhängig von der c-Jun bZip-Domäne (Diamond et al., 1990, Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Die bZip-Domäne erlaubt somit spezifische Wechselwirkungen mit einer Reihe verschiedener Proteine. Es ist vorstellbar, dass sich die dargestellten Faktoren gegenseitig in ihrer Interaktion mit c-Jun beeinflussen und damit die Funktion von c-Jun modulieren.

c-Jun kann durch die GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) oder CKII (Casein Kinase II) in der DNA-Bindedomäne an Serin 249 phosphoryliert werden (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Der Austausch von Serin 249 des c-Jun Proteins zeigte keinen Einfluss auf die Interaktion mit hTAFII55. Jedoch wurden die verwendeten Jun-Proteine im Retikulocytenlysat durch *in-vitro* Translation gewonnen, so dass c-Jun an der DNA-Bindedomäne nicht phosphoryliert war. Obwohl die Phosphorylierungsstellen für die Interaktion von c-Jun mit hTAFII55 nicht essentiell sind, könnte somit eine Phosphorylierung der betreffenden Stellen die Interaktion durchaus beeinflussen. Um hierüber eine Aussage treffen zu können müssten Interaktionsstudien mit c-Jun durchgeführt werden, welches durch die GSK-3 phosphoryliert wurde.

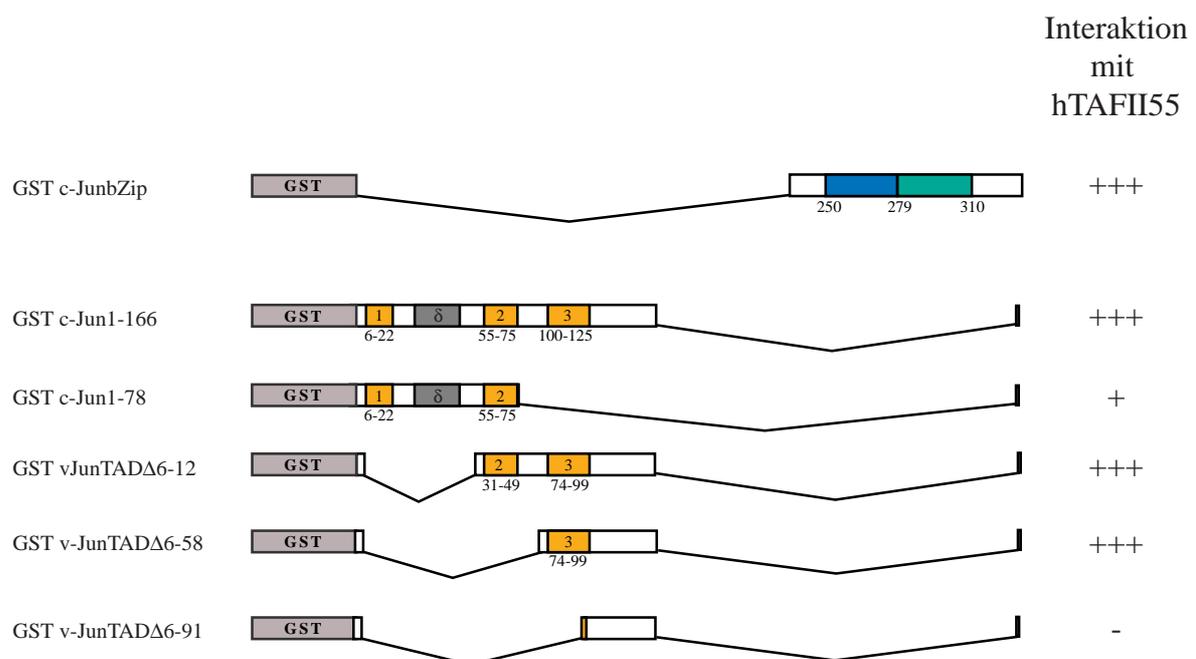


Abb. 26 Übersicht über die Interaktionen zwischen hTAFII55 und c-Jun.

Die untersuchten c-Jun Deletionsmutanten wurden schematisch dargestellt. Die sauren Regionen der Transaktivierungsdomänen sind in gelb, die basische Region in blau und die Leucin-Zipper Region in grün abgebildet. (+) gibt an, dass hTAFII55 mit dem betreffenden Protein interagiert. (-) gibt an, dass keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Die Anzahl der (+) zeigt die Stärke der Interaktion an.

Wie in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden konnte, scheint die Bindung von hTAFII55 an die c-Jun Transaktivierungsdomäne, im Gegensatz zur direkten Interaktion mit der DNA-Bindedomäne, von weiteren Faktoren abhängig zu sein. So konnte zwischen der c-Jun Transaktivierungsdomäne und hTAFII55 keine Interaktion nachgewiesen

werden, wenn beide Proteine durch *in-vitro*-Translation im Retikulocytenlysat bzw. als GST-Fusionsproteine durch Überexpression in *E.coli* gewonnen wurden. Hingegen interagieren hTAFII55 und die c-Jun Transaktivierungsdomäne, wenn eines der Proteine durch Überexpression in HEK293-Zellen hergestellt wurde. Dies deutet stark darauf hin, dass die Interaktion zwischen hTAFII55 entweder indirekt ist und so vom Vorhandensein eines Brückenproteins abhängt, oder dass Modifikationen des hTAFII55 oder des c-Jun Proteins notwendig sind. Bisher ist wenig über mögliche Modifikationen von hTAFII55 bekannt. Alleine die Phosphorylierung durch TIF1alpha ist bisher gezeigt worden. TIF1alpha ist eine Proteinkinase, die nach Interaktion mit den ligandenassoziierten, nucleären Rezeptoren ER (**E**strogen **R**eceptor) und RXR α (**R**etinoid **X** **R**eceptor) hyperphosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Fraser et al., 1998). Die in den Interaktionsstudien verwendeten Extrakte aus HEK293-Zellen stammten aus Zellen, welche nicht mit Rezeptor-Liganden behandelt wurden. Daher kann eine Aktivierung von TIF1alpha und damit eine Phosphorylierung von hTAFII55 durch TIF1alpha ausgeschlossen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass hTAFII55 von weiteren, bisher unidentifizierten Kinasen phosphoryliert wird.

Durch Interaktionsstudien mit Deletionsmutanten der c-Jun Transaktivierungsdomäne konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass hTAFII55 zwei unabhängige Bereiche in der c-Jun Transaktivierungsdomäne kontaktiert. hTAFII55 interagiert mit Region 1-79 und 87-119 des c-Jun Proteins, wobei die Interaktion von hTAFII55 mit Region 87-119 ca. 5-8fach stärker ist, als die mit Region 1-79 (Zusammenfassung der Interaktionsstudien Abb. 26).

Es wurde aufgrund von *in-vivo* Konkurrenzexperimenten schon seit längerem postuliert, dass die sauren Transkriptionsfaktoren c-Jun und VP-16 zumindest einen gemeinsamen Koaktivator haben. Interaktionsstudien zeigten, dass dieser ein noch nicht weiter identifizierter Komplex mit dem Molekulargewicht von p52/54 ist (Oehler und Angel, 1992). Im Gegensatz zu hTAFII55 ist für die Interaktion mit dem Koaktivator Komplex p52/54 jedoch die erste saure Region (Aminosäuren 6-12) der c-Jun Transaktivierungsdomäne essentiell. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei p52/55 um hTAFII55 handelt.

CBP (**C**REB **B**inding **P**rotein), ein Koaktivator, dessen Überexpression ebenfalls die c-Jun abhängige Transaktivierung stimuliert interagiert mit der Transaktivierungsdomäne von c-Jun (Aminosäuren 1-87), jedoch nicht mit dessen DNA-Bindedomäne.

Auch TBP (**TATA-Binding Protein**), die zentrale Komponente des TFIID-Komplexes, interagiert mit c-Jun. Ähnlich hTAFII55 bindet TBP die Transaktivierungsdomäne und die DNA-Bindedomäne von c-Jun (Ransone et al., 1993; Franklin et al., 1995). Jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass eine Überexpression von TBP die c-Jun abhängige Transaktivierung stimuliert. Die physiologische Rolle der TBP/c-Jun Interaktion ist daher nicht geklärt.

In c-Jun sind die zwei funktionellen Bereiche der DNA-Bindung und der Transaktivierung räumlich getrennt. Regionen mit Transaktivierungsfunktion finden sich ausschließlich im N-Terminus des Proteins. Die DNA-Bindefunktion ist im C-terminalen Teil angesiedelt (Bohmann, 1987; Angel et al., 1988). Es stellt sich daher die Frage nach der physiologischen Funktion der Interaktion zwischen hTAFII55 und der bZip Region von c-Jun. Interessanterweise interagiert hTAFII55 auch mit der DNA-Bindedomäne von YY1. Da YY1 nicht nur als transkriptioneller Aktivator, sondern auch als Repressor fungieren kann, wurde vermutet, dass diese Interaktion für die Repressorfunktion von YY1 von Bedeutung ist (Austen et al., 1997). Der RSV-Promotor enthält eine YY1-Bindestelle (Mobley und Sealy 1998). Daher ist der Befund, dass eine Überexpression von hTAFII55 in HEK293-Zellen zur Repression der RSV-Promotoraktivität führt, ein weiterer Hinweis darauf, dass hTAFII55 in die Repression von Transkription involviert ist. Studien in Ras-transformierten Fibroblastenzelllinien zeigten, dass zwei SRE (**Serum Response Elements**) im α -Aktin Promotor für dessen Repression verantwortlich sind. Als Transkriptionsfaktoren, die an die SREs binden und eine repressorische Wirkung ausüben, wurden neben c-Fos auch c-Jun und YY1 identifiziert (Bushel et al., 1995). Auch bei der Regulation der Expression des GM-CSF (**Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor**)-Gens wirken c-Jun und YY1 zusammen. In diesem Fall ist c-Jun zusammen mit Sp-1 für die Stimulation der Expression von GM-CSF notwendig, während YY1 die c-Jun und Sp-1 vermittelte Transaktivierung reprimiert. Für c-Jun selbst wurde eine Repressorfunktion im Fall des p53-Gens beschrieben. Hierfür ist die Bindung von c-Jun mit bisher nicht identifizierten Faktoren an den p53-Promotor notwendig. Eine Bedeutung von hTAFII55 in der Repression der Transkription durch c-Jun alleine oder in Kombination mit YY1 wäre denkbar.

Es bietet sich jedoch noch eine weitere mögliche physiologische Funktion für die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip-Domäne an. Im Gegensatz zur Interaktion von hTAFII55 mit der c-Jun bZip-Domäne, ist die Interaktion mit der c-Jun

Transaktivierungsdomäne abhängig von zusätzlichen Faktoren. Die Interaktion mit der c-Jun DNA-Bindedomäne könnte damit, unabhängig von weiteren Faktoren, zur Effizienz der Rekrutierung von hTAFII55 an Promotoren beitragen. Einen ähnlichen Mechanismus kommt in der Interaktion zwischen dem Koaktivator BOB.1/OBF.1 und den sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2 zum tragen. (Pfisterer et al., 1995).

6.3.2 Die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun DBD wird nach Bindung von c-Jun an DNA gelöst

Werden hTAFII55 und c-Jun als Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und gereinigt bzw. in einem *in-vitro* Translationssystem in Retikulocytenlysate hergestellt, so wird die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun DNA-Bindedomäne gelöst, sobald c-Jun an sein DNA-Konsensusmotiv bindet. Wenn in der Reaktion jedoch Gesamtextrakt aus HEK293-Zellen und damit zusätzliche zelluläre Faktoren vorhanden sind, kann eine Interaktion zwischen DNA-gebundenem c-Jun und hTAFII55 beobachtet werden. Dies sind Bedingungen, die eine Interaktion von hTAFII55 mit der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins erlauben. Der Befund lässt daher vermuten, dass nach der Bindung von c-Jun an DNA, zwar die Interaktion von hTAFII55 mit der DNA-Bindedomäne gelöst wird, jedoch die Interaktion mit der Transaktivierungsdomäne erhalten bleibt, bzw. vielleicht sogar dann erst stattfindet.

Mit Hilfe von transienten Transfektionen in HEK293-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass die Aktivität eines Fusionsproteins aus der c-Jun Transaktivierungsdomäne und der Gal4 DBD (Gal4 c-Jun) durch eine Überexpression von hTAFII55 um ca. 30% gesteigert werden kann. Die beobachteten Effekte sind jedoch bei weitem nicht so drastisch, wie im Falle von wildtyp c-Jun (400%). Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die c-Jun DBD bei der Aktivierung durch hTAFII55 tatsächlich eine Rolle spielt. Es kommen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: (1) Wildtyp c-Jun bindet als Dimer an DNA. Hingegen bindet das Fusionsprotein Gal4 c-Jun als Monomer an den Promotor des verwendeten Reportergens. Möglicherweise spielt die Dimerisierung von c-Jun bei der Aktivierung durch hTAFII55 eine Rolle. (2) Da hTAFII55 nicht nur mit der Transaktivierungsdomäne von c-Jun sondern auch mit der DBD interagiert, könnte die DBD die Affinität von hTAFII55 zu c-Jun erhöhen, wenn dieses nicht an DNA gebunden ist. Dadurch würden c-Jun und hTAFII55 schon als Dimer

an die AP-1 Konsensussequenz binden, die lokale Konzentration an hTAFII55 würde erhöht und damit auch die Effizienz, mit der c-Jun Transkription stimulieren kann. Ein Koaktivator, der diesen Mechanismus nutzt ist der B-Zell spezifische Koaktivator BOB.1/OBF.1. BOB.1 interagiert mit der POU-Domäne der Transkriptionsfaktoren Oct1 und 2 und aktiviert die Transkription oktamer-abhängiger Promotoren (Pfisterer et al., 1995). (2) Die Bindung von c-Jun an DNA könnte zu einer intramolekularen Signaltransduktion in Form einer strukturellen Veränderung des c-Jun Moleküls führen. Tatsächlich ist bereits eine Form der intramolekularen Signaltransduktion im c-Jun Protein bekannt. Nach Phosphorylierung des c-Jun N-Terminus wird die Hyperphosphorylierung der DBD, vermutlich durch Strukturveränderung im c-Jun Protein, gehemmt (Papavassilou et al., 1992). Es ist vorstellbar, dass die Bindung von c-Jun an DNA zwar zum Lösen der Interaktion zwischen hTAFII55 und c-Jun DBD führt, jedoch auch zu einer verstärkten Interaktion mit der c-Jun Transaktivierungsdomäne.

6.3.3 hTAFII55 interagiert präferentiell mit S63/73-phosphoryliertem c-Jun, welches an DNA gebunden ist

Die Aktivität von c-Jun wird durch Phosphorylierung am N-Terminus an Position S63/73 durch Kinasen der MAPK-Familie positiv reguliert (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991; Hibi et al., 1993; Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Gupta et al., 1996; Franklin et al., 1992). Der Mechanismus, der dieser Aktivierung zugrunde liegt, ist bisher nur teilweise geklärt worden. So konnte zum einen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des c-Jun N-Terminus an Position 63/73 zur Stabilisierung des c-Jun Proteins führt (Musti et al., 1997). Zum anderen induziert die Phosphorylierung des c-Jun N-Terminus eine strukturelle Änderung des c-Jun Proteins, so dass eine Hyperphosphorylierung und damit eine negative Regulation der DNA-Bindeaffinität des c-Jun Proteins verhindert wird (Papavassilou et al., 1992). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten erweitern die Möglichkeiten die Aktivierung des c-Jun Proteins nach Phosphorylierung an Position S63/73 zu erklären. Die Befunde legen dar, dass hTAFII55 *in-vivo* bevorzugt mit solchem c-Jun interagiert, welches an Ser 63/73 phosphoryliert und spezifisch an DNA gebunden ist. hTAFII55 bindet zwar auch an die unphosphorylierte und DNA-ungebundene Form von c-Jun, jedoch mit geringerer Affinität. Bisher wurden p300/CBP und p52/54 als c-Jun-kontaktierende Koaktivatoren beschrieben. p300/CBP

interagiert mit der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins. Dies geschieht zwar abhängig von den Serinresten an Position 63/73, allerdings ist für die Interaktion die Phosphorylierung von c-Jun ohne Bedeutung (Bannister et al., 1995). Auch p52/54 interagiert mit c-Jun unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus (Oehler und Angel, 1992). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen c-Jun und einer Komponente der Transkriptionsmaschinerie, durch Phosphorylierung des c-Jun N-Terminus stimuliert werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Daten wurden in einem Modell zusammengefasst, in dem c-Jun hTAFII55 als einen Teil der RNA-Polymerase II kontaktiert, um so Transkription zu aktivieren. In diesem Modell wird hTAFII55 durch c-Jun an AP-1 abhängige Promotoren rekrutiert. Die Bindung von c-Jun an DNA führt zu einem Verlust der Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip-Domäne. Als DNA-gebundene Form interagiert c-Jun ausschließlich über die Transaktivierungsdomäne mit hTAFII55. Die Interaktion von hTAFII55 mit der Transaktivierungsdomäne von c-Jun führt zu einer verstärkten Rekrutierung des RNA-Polymerase II Transkriptionskomplexes an den Promotor und damit zur transkriptionellen Aktivierung. Phosphorylierung des c-Jun Proteins am N-Terminus verstärkt die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun Transaktivierungsdomäne und resultiert damit in einer weiteren, verstärkten Aktivierung der Transkription (Abb. 27).

hTAFII55 ist jedoch nicht nur Bestandteil des TFIID-Komplexes, sondern auch des erst kürzlich isolierten TFIIIC-Komplexes. Der TFIIIC-Komplex kann in basaler und aktivierter Transkription den TFIID-Komplex substituieren. Er enthält aber auch eine Untereinheit mit Acetyltransferase-Aktivität, die homolog zum yGCN5 Protein ist (Brand et al., 1999a und b).

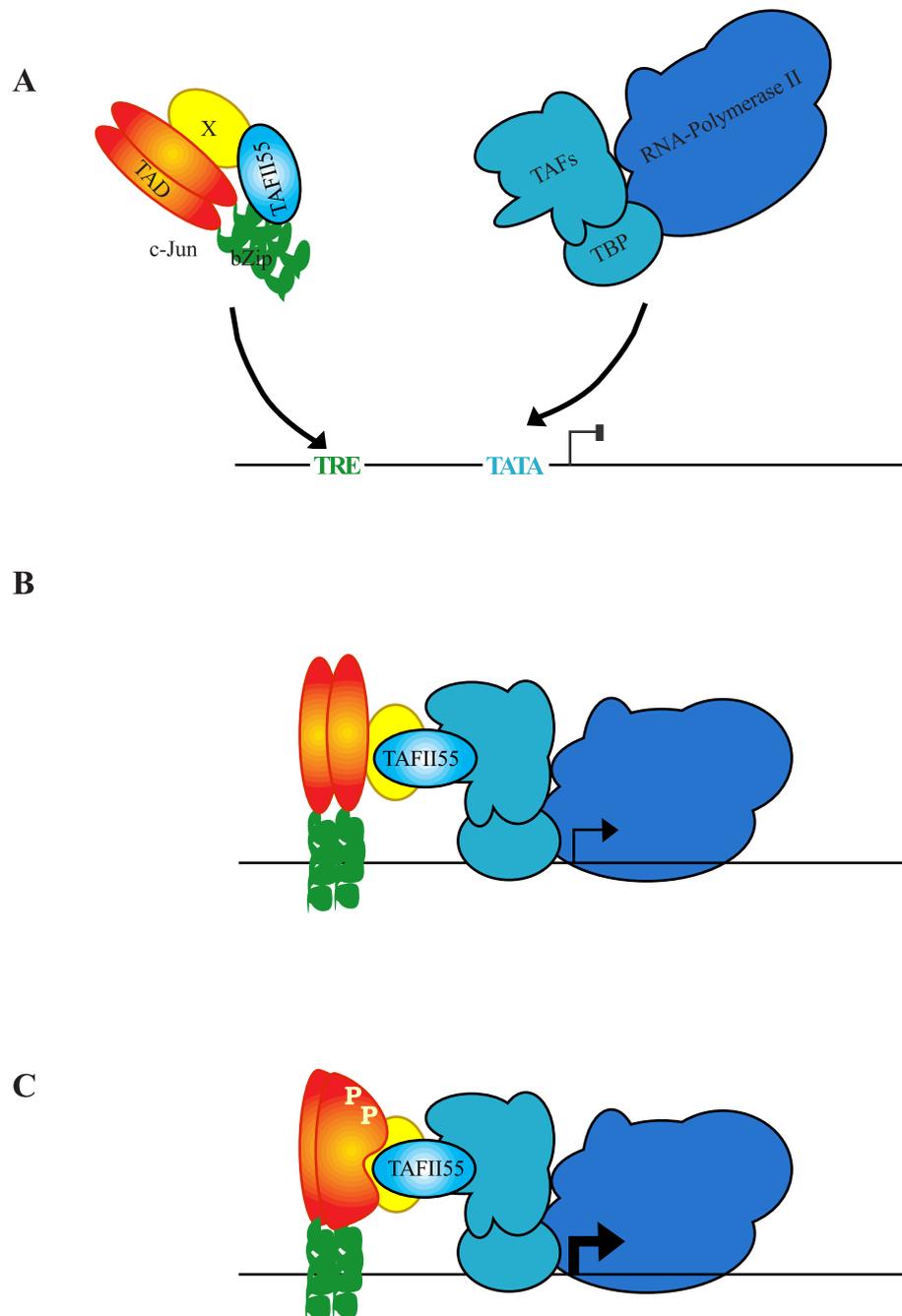


Abb. 27 Modell zur Steigerung des Transaktivierungspotentials von c-Jun durch hTAFII55

hTAFII55 wird durch c-Jun zu Promotoren rekrutiert, die ein TRE enthalten. Die Bindung von c-Jun an DNA führt zu einem Verlust der Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun bZip-Domäne. Als DNA-gebundene Form interagiert c-Jun ausschließlich über die Transaktivierungsdomäne mit hTAFII55. Die Interaktion von hTAFII55 mit der Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins führt zu einer verstärkten Rekrutierung des RNA-Polymerase II Transkriptionskomplexes an den Promotor und damit zur transkriptionellen Aktivierung. Phosphorylierung des c-Jun Proteins am N-Terminus verstärkt die Interaktion zwischen hTAFII55 und der c-Jun Transaktivierungsdomäne und resultiert damit in einer weiteren, verstärkten Aktivierung der Transkription

Es besteht die Möglichkeit, dass c-Jun diesen Komplex über die Interaktion mit hTAFII55 zu Promotoren rekrutiert und auf diese Weise Transkription aktiviert. Mit hTAFII55 wurde neben CBP und p52/54 ein weiteres Protein identifiziert, das die c-Jun abhängige Transaktivierung stimuliert. Für die Interaktion von p52/54 mit c-Jun ist die erste saure Region (Aminosäuren 6-12) des c-Jun Proteins essentiell (Oehler und Angel, 1992). Auch CBP bindet an den N-terminalen Bereich der c-Jun Transaktivierungsdomäne (Aminosäuren 1-87), (Bannister et al., 1995). Hingegen kontaktiert hTAFII55 mit hoher Affinität die dritte saure Region (87-119) der c-Jun Transaktivierungsdomäne. In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, dass die Aktivitäten der einzelnen sauren Regionen der c-Jun Transaktivierungsdomäne additiv oder sogar synergistisch sind. Eine gleichzeitige Interaktion der c-Jun Transaktivierungsdomäne mit CBP oder p52/54 und hTAFII55 könnte diese Effekte erklären.

Inwieweit CBP oder p52/54 mit hTAFII55 in der Weiterleitung des c-Jun Transaktivierungssignales zusammenwirken, könnte durch Transaktivierungsexperimente in Zellen, deren hTAFII55-Gen durch homologe Rekombination deletiert wurde, beantwortet werden. Mit Hilfe dieser Zellen wäre auch die Voraussetzung gegeben die Fragen zu klären, ob hTAFII55 für die Aktivität von c-Jun essentiell ist bzw. welchen Beitrag hTAFII55 zur Vermittlung des Transaktivierungssignales von c-Jun und weiterer Mitglieder der AP-1 Familie leistet.

7. ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBFA1	Core Binding Factor Alpha 1
CBP	CREB Binding Protein
CEFs	Chicken Embryonic Fibroblasts
CKII	Casein Kinase II
CRE	CRE Response Element
DBD	DNA Bindedomäne
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ER	Estrogen Receptor
GM CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTF	Generelle Transkriptionsfaktoren
HAT	Histon-Acetyltransferase
Inr	Initiator Element
JNKs	Jun-N-terminal Kinases
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
PIC	Präinitiations Komplex
m(RNA)	messenger RNA
r(RNA)	ribosomale RNA
Rnase	Ribonuclease
RXR	Retinoid X Receptor
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	Serum Response Elements

SV40	Simian Virus 40
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAFs	TBP Associated Factors
TBP	TATA-Binding Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TK	Thymidin-Kinase
TR α	Thyroid-Hormone Receptor
TRE	TPA Responsive Element
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
VDR	Vitamin D3 Receptor

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, V., M. R. Pincus, P. W. Brandt-Rauf and Z. Ronai (1995). "Complexes of p21RAS with JUN N-terminal kinase and JUN proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10585-9.
- Albanese, C., M. D'Amico, A. T. Reutens, M. Fu, G. Watanabe, R. J. Lee, R. N. Kitsis, B. Henglein, M. Avantaggiati, K. Somasundaram, B. Thimmapaya and R. G. Pestell (1999). "Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis." J Biol Chem **274**(48): 34186-95.
- Allard, S., R. T. Utley, J. Savard, A. Clarke, P. Grant, C. J. Brandl, L. Pillus, J. L. Workman and J. Cote (1999). "NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p." Embo J **18**(18): 5108-19.
- Angel, P., E. A. Allegretto, S. T. Okino, K. Hattori, W. J. Boyle, T. Hunter and M. Karin (1988). "Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1." Nature **332**(6160): 166-71.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich and M. Karin (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." Cell **49**(6): 729-39.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-57.
- Angel, P., T. Smeal, J. Meek and M. Karin (1989). "Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner." New Biol **1**(1): 35-43.
- Apone, L. M., C. A. Virbasius, F. C. Holstege, J. Wang, R. A. Young and M. R. Green (1998). "Broad, but not universal, transcriptional requirement for yTAFII17, a histone H3-like TAFII present in TFIID and SAGA." Mol Cell **2**(5): 653-61.

- Arias, J., A. S. Alberts, P. Brindle, F. X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco and M. Montminy (1994). "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor [see comments]." *Nature* **370**(6486): 226-9.
- Austen, M., B. Luscher and J. M. Luscher-Firzlaff (1997). "Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein." *J Biol Chem* **272**(3): 1709-17.
- Auwerx, J. and P. Sassone-Corsi (1991). "IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation." *Cell* **64**(5): 983-93.
- Auwerx, J. and P. Sassone-Corsi (1992). "AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1: effect of signal transduction pathways and cell growth." *Oncogene* **7**(11): 2271-80.
- Baichwal, V. R., A. Park and R. Tjian (1991). "v-Src and EJ Ras alleviate repression of c-Jun by a cell-specific inhibitor." *Nature* **352**(6331): 165-8.
- Baichwal, V. R. and R. Tjian (1990). "Control of c-Jun activity by interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain delta: differences between v- and c-Jun." *Cell* **63**(4): 815-25.
- Bakiri, L., D. Lallemand, E. Bossy-Wetzel and M. Yaniv (2000). "Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression." *Embo J* **19**(9): 2056-68.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (1995). "CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A." *Embo J* **14**(19): 4758-62.
- Bannister, A. J., T. Oehler, D. Wilhelm, P. Angel and T. Kouzarides (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**(12): 2509-14.
- Barila, D., R. Mangano, S. Gonfloni, J. Kretzschmar, M. Moro, D. Bohmann and G. Superti-Furga (2000). "A nuclear tyrosine phosphorylation circuit: c-Jun as an activator and substrate of c-Abl and JNK." *Embo J* **19**(2): 273-81.
- Behre, G., A. J. Whitmarsh, M. P. Coghlan, T. Hoang, C. L. Carpenter, D. E. Zhang, R. J. Davis and D. G. Tenen (1999). "c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor." *J Biol Chem* **274**(8): 4939-46.

- Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub and I. M. Verma (1992). "Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association." *Cell* **68**(3): 507-19.
- Ben-Hattar, J., P. Beard and J. Jiricny (1989). "Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription in vivo and on factor binding in vitro." *Nucleic Acids Res* **17**(24): 10179-90.
- Berger, S. L., B. Pina, N. Silverman, G. A. Marcus, J. Agapite, J. L. Regier, S. J. Triezenberg and L. Guarente (1992). "Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains." *Cell* **70**(2): 251-65.
- Binetruy, B., T. Smeal and M. Karin (1991). "Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain." *Nature* **351**(6322): 122-7.
- Bodner, M., J. L. Castrillo, L. E. Theill, T. Deerinck, M. Ellisman and M. Karin (1988). "The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox- containing protein." *Cell* **55**(3): 505-18.
- Bohmann, D., T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt and R. Tjian (1987). "Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1." *Science* **238**(4832): 1386-92.
- Bohmann, D., M. C. Ellis, L. M. Staszewski and M. Mlodzik (1994). "Drosophila Jun mediates Ras-dependent photoreceptor determination." *Cell* **78**(6): 973-86.
- Bohmann, D. and R. Tjian (1989). "Biochemical analysis of transcriptional activation by Jun: differential activity of c- and v-Jun." *Cell* **59**(4): 709-17.
- Bos, T. J., D. Bohmann, H. Tsuchie, R. Tjian and P. K. Vogt (1988). "v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP- 1." *Cell* **52**(5): 705-12.
- Bos, T. J., F. S. Monteclaro, F. Mitsunobu, A. R. Ball, Jr., C. H. Chang, T. Nishimura and P. K. Vogt (1990). "Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences." *Genes Dev* **4**(10): 1677-87.
- Bossy-Wetzell, E., L. Bakiri and M. Yaniv (1997). "Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun." *Embo J* **16**(7): 1695-709.
- Boyle, W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin and T. Hunter (1991). "Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity." *Cell* **64**(3): 573-84.

- Brand, M., C. Leurent, V. Mallouh, L. Tora and P. Schultz (1999). "Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC." Science **286**(5447): 2151-3.
- Brand, M., K. Yamamoto, A. Staub and L. Tora (1999). "Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction." J Biol Chem **274**(26): 18285-9.
- Brenner, D. A., M. O'Hara, P. Angel, M. Chojkier and M. Karin (1989). "Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha." Nature **337**(6208): 661-3.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter and M. C. Gustin (1993). "An osmosensing signal transduction pathway in yeast." Science **259**(5102): 1760-3.
- Brown, P. H., T. K. Chen and M. J. Birrer (1994). "Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun." Oncogene **9**(3): 791-9.
- Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis (1996). "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast GCN5p linking histone acetylation to gene activation." Cell **84**(6): 843-51.
- Burley, S. K. and R. G. Roeder (1996). "Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)." Annu Rev Biochem **65**: 769-99.
- Bushel, P., J. H. Kim, W. Chang, J. J. Catino, H. E. Ruley and C. C. Kumar (1995). "Two serum response elements mediate transcriptional repression of human smooth muscle alpha-actin promoter in ras-transformed cells." Oncogene **10**(7): 1361-70.
- Candau, R., P. A. Moore, L. Wang, N. Barlev, C. Y. Ying, C. A. Rosen and S. L. Berger (1996). "Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5." Mol Cell Biol **16**(2): 593-602.
- Carillo, S., M. Pariat, A. M. Steff, P. Roux, M. Etienne-Julan, T. Lorca and M. Piechaczyk (1994). "Differential sensitivity of FOS and JUN family members to calpains." Oncogene **9**(6): 1679-89.
- Chae, H. Z. and S. G. Rhee (1994). "A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function." Biofactors **4**(3-4): 177-80.
- Chae, H. Z., T. B. Uhm and S. G. Rhee (1994). "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7022-6.

- Chakravarti, D., V. J. LaMorte, M. C. Nelson, T. Nakajima, I. G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy and R. M. Evans (1996). "Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling [see comments]." *Nature* **383**(6595): 99-103.
- Chen, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani and R. M. Evans (1997). "Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300." *Cell* **90**(3): 569-80.
- Chiang, C. M. and R. G. Roeder (1995). "Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators." *Science* **267**(5197): 531-6.
- Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy and R. H. Goodman (1993). "Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP." *Nature* **365**(6449): 855-9.
- Claret, F. X., M. Hibi, S. Dhut, T. Toda and M. Karin (1996). "A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors." *Nature* **383**(6599): 453-7.
- Colgan, J., H. Ashali and J. L. Manley (1995). "A direct interaction between a glutamine-rich activator and the N terminus of TFIIB can mediate transcriptional activation in vivo." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2311-20.
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, D. X. Hou, T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Takahashi and S. Ishii (1996). "CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb." *Genes Dev* **10**(5): 528-40.
- Dai, T., E. Rubie, C. C. Franklin, A. Kraft, D. A. Gillespie, J. Avruch, J. M. Kyriakis and J. R. Woodgett (1995). "Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function." *Oncogene* **10**(5): 849-55.
- Deng, T. and M. Karin (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**(3): 479-90.
- Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin and R. J. Davis (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* **76**(6): 1025-37.

- Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal and M. M. Zhou (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." Nature **399**(6735): 491-6.
- Diamond, M. I., J. N. Miner, S. K. Yoshinaga and K. R. Yamamoto (1990). "Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element." Science **249**(4974): 1266-72.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall and G. Karsenty (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [see comments]." Cell **89**(5): 747-54.
- Dudley, A. M., L. J. Gansheroff and F. Winston (1999). "Specific components of the SAGA complex are required for GCN4- and Gcr1- mediated activation of the his4-912delta promoter in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **151**(4): 1365-78.
- Dudley, A. M., C. Rougeulle and F. Winston (1999). "The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo." Genes Dev **13**(22): 2940-5.
- Dynlacht, B. D., T. Hoey and R. Tjian (1991). "Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation." Cell **66**(3): 563-76.
- Eberharter, A., S. John, P. A. Grant, R. T. Utley and J. L. Workman (1998). "Identification and analysis of yeast nucleosomal histone acetyltransferase complexes." Methods **15**(4): 315-21.
- Eberharter, A., D. E. Sterner, D. Schieltz, A. Hassan, J. R. Yates, 3rd, S. L. Berger and J. L. Workman (1999). "The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **19**(10): 6621-31.
- Eisenmann, D. M., K. M. Arndt, S. L. Ricupero, J. W. Rooney and F. Winston (1992). "SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **6**(7): 1319-31.
- Eisenmann, D. M., C. Chapon, S. M. Roberts, C. Dollard and F. Winston (1994). "The *Saccharomyces cerevisiae* SPT8 gene encodes a very acidic protein that is functionally related to SPT3 and TATA-binding protein." Genetics **137**(3): 647-57.
- Franklin, C. C., A. V. McCulloch and A. S. Kraft (1995). "In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB." Biochem J **305**(Pt 3): 967-74.

- Franklin, C. C., V. Sanchez, F. Wagner, J. R. Woodgett and A. S. Kraft (1992). "Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7247-51.
- Fraser, R. A., D. J. Heard, S. Adam, A. C. Lavigne, B. Le Douarin, L. Tora, R. Losson, C. Rochette-Egly and P. Chambon (1998). "The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors." J Biol Chem **273**(26): 16199-204.
- Fuchs, S. Y., L. Dolan, R. J. Davis and Z. Ronai (1996). "Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N- kinase." Oncogene **13**(7): 1531-5.
- Ge, H. and R. G. Roeder (1994). "Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes." Cell **78**(3): 513-23.
- Gentz, R., F. J. d. Rauscher, C. Abate and T. Curran (1989). "Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains." Science **243**(4899): 1695-9.
- Georgakopoulos, T. and G. Thireos (1992). "Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription." Embo J **11**(11): 4145-52.
- Glass, C. K., D. W. Rose and M. G. Rosenfeld (1997). "Nuclear receptor coactivators." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 222-32.
- Goodrich, D. W. and W. H. Lee (1993). "Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene." Biochim Biophys Acta **1155**(1): 43-61.
- Grant, P. A., L. Duggan, J. Cote, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger and J. L. Workman (1997). "Yeast GCN5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex." Genes Dev **11**(13): 1640-50.
- Green, V. J., E. Kokkotou and J. A. Ladias (1998). "Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4." J Biol Chem **273**(45): 29950-7.
- Gupta, R., A. Emili, G. Pan, H. Xiao, M. Shales, J. Greenblatt and C. J. Ingles (1996). "Characterization of the interaction between the acidic activation domain of VP16

- and the RNA polymerase II initiation factor TFIIB." Nucleic Acids Res **24**(12): 2324-30.
- Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard and R. J. Davis (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." Embo J **15**(11): 2760-70.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov and R. Brent (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." Cell **75**(4): 791-803.
- Hagmeyer, B. M., H. Konig, I. Herr, R. Offringa, A. Zantema, A. van der Eb, P. Herrlich and P. Angel (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**(9): 3559-72.
- Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3720-4.
- Hampsey, M. (1997a). "A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **13**(12): 1099-133.
- Hampsey, M. (1997b). "A SAGA of histone acetylation and gene expression." Trends Genet **13**(11): 427-9.
- Herr, I., H. van Dam and P. Angel (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**(6): 1105-13.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden and M. Karin (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." Genes Dev **7**(11): 2135-48.
- Hilberg, F. and E. F. Wagner (1992). "Embryonic stem (ES) cells lacking functional c-jun: consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity." Oncogene **7**(12): 2371-80.
- Hirai, S., H. Kawasaki, M. Yaniv and K. Suzuki (1991). "Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain." FEBS Lett **287**(1-2): 57-61.
- Hochstrasser, D. F., S. Frutiger, N. Paquet, A. Bairoch, F. Ravier, C. Pasquali, J. C. Sanchez, J. D. Tissot, B. Bjellqvist, R. Vargas and et al. (1992). "Human liver protein map: a reference database established by microsequencing and gel comparison." Electrophoresis **13**(12): 992-1001.

- Hoey, T., R. O. Weinzierl, G. Gill, J. L. Chen, B. D. Dynlacht and R. Tjian (1993). "Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators." *Cell* **72**(2): 247-60.
- Ikeda, K., D. J. Steger, A. Eberharter and J. L. Workman (1999). "Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes." *Mol Cell Biol* **19**(1): 855-63.
- Ishii, T., T. Kawane, S. Taketani and S. Bannai (1995). "Inhibition of the thiol-specific antioxidant activity of rat liver MSP23 protein by hemin." *Biochem Biophys Res Commun* **216**(3): 970-5.
- Iwahara, S., H. Satoh, D. X. Song, J. Webb, A. L. Burlingame, Y. Nagae and U. Muller-Eberhard (1995). "Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol." *Biochemistry* **34**(41): 13398-406.
- Jacq, X., C. Brou, Y. Lutz, I. Davidson, P. Chambon and L. Tora (1994). "Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor." *Cell* **79**(1): 107-17.
- Janknecht, R. and T. Hunter (1996). "Transcription. A growing coactivator network [news; comment]." *Nature* **383**(6595): 22-3.
- Johnson, R. S., B. van Lingen, V. E. Papaioannou and B. M. Spiegelman (1993). "A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture." *Genes Dev* **7**(7B): 1309-17.
- Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta and P. Herrlich (1990). "Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone." *Cell* **62**(6): 1189-204.
- Kaiser, K. and M. Meisterernst (1996). "The human general co-factors [see comments]." *Trends Biochem Sci* **21**(9): 342-5.
- Kaiser, K., G. Stelzer and M. Meisterernst (1995). "The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation." *Embo J* **14**(14): 3520-7.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." *Cell* **85**(3): 403-14.

- Kardassis, D., P. Papakosta, K. Pardali and A. Moustakas (1999). "c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1." *J Biol Chem* **274**(41): 29572-81.
- Kawai, S., S. Takeshita, M. Okazaki, R. Kikuno, A. Kudo and E. Amann (1994). "Cloning and characterization of OSF-3, a new member of the MER5 family, expressed in mouse osteoblastic cells." *J Biochem (Tokyo)* **115**(4): 641-3.
- Kawasaki, H., L. Schiltz, R. Chiu, K. Itakura, K. Taira, Y. Nakatani and K. K. Yokoyama (2000). "ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation." *Nature* **405**(6783): 195-200.
- Keaveney, M. and K. Struhl (1998). "Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast." *Mol Cell* **1**(6): 917-24.
- Kelleher, R. J. d., P. M. Flanagan, D. I. Chasman, A. S. Ponticelli, K. Struhl and R. D. Kornberg (1992). "Yeast and human TFIIDs are interchangeable for the response to acidic transcriptional activators in vitro." *Genes Dev* **6**(2): 296-303.
- Kilbey, A., E. J. Black, M. Unlu and D. A. Gillespie (1996). "The v-Jun oncoprotein replaces p39 c-Jun as the predominant AP-1 constituent in ASV17-transformed fibroblasts: implications for SAPK/JNK- mediated signal transduction." *Oncogene* **12**(11): 2409-18.
- Kim, A. T., T. A. Sarafian and H. Shau (1997). "Characterization of antioxidant properties of natural killer-enhancing factor-B and induction of its expression by hydrogen peroxide." *Toxicol Appl Pharmacol* **147**(1): 135-42.
- Klages, N. and M. Strubin (1995). "Stimulation of RNA polymerase II transcription initiation by recruitment of TBP in vivo." *Nature* **374**(6525): 822-3.
- Kockel, L., J. Zeitlinger, L. M. Staszewski, M. Mlodzik and D. Bohmann (1997). "Jun in *Drosophila* development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways [published erratum appears in *Genes Dev* 1998 Feb 1;12(3):447]." *Genes Dev* **11**(13): 1748-58.
- Konig, H., H. Ponta, H. J. Rahmsdorf and P. Herrlich (1992). "Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo." *Embo J* **11**(6): 2241-6.

- Kornberg, R. D. and J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." Science **184**(139): 865-8.
- Kouzarides, T. and E. Ziff (1988). "The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction." Nature **336**(6200): 646-51.
- Kovary, K. and R. Bravo (1991). "The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts." Mol Cell Biol **11**(9): 4466-72.
- Kretzschmar, M., K. Kaiser, F. Lottspeich and M. Meisterernst (1994). "A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators." Cell **78**(3): 525-34.
- Kwok, R. P., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green and R. H. Goodman (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB [see comments]." Nature **370**(6486): 223-6.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch and J. R. Woodgett (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." Nature **369**(6476): 156-60.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, E. Y. Adashi, B. J. Graves and S. L. McKnight (1988). "Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP [published erratum appears in Genes Dev 1994 May 1;8(9):1131]." Genes Dev **2**(7): 786-800.
- Lavigne, A. C., G. Mengus, Y. G. Gangloff, J. M. Wurtz and I. Davidson (1999). "Human TAF(II)55 interacts with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors and with derivatives of the retinoid X receptor that have altered transactivation properties." Mol Cell Biol **19**(8): 5486-94.
- Lee, W., A. Haslinger, M. Karin and R. Tjian (1987). "Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40." Nature **325**(6102): 368-72.
- Lee, W., P. Mitchell and R. Tjian (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." Cell **49**(6): 741-52.
- Leppa, S. and D. Bohmann (1999). "Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis." Oncogene **18**(45): 6158-62.
- Leppa, S., R. Saffrich, W. Ansorge and D. Bohmann (1998). "Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation." Embo J **17**(15): 4404-13.

- Li, Q., A. Imhof, T. N. Collingwood, F. D. Urnov and A. P. Wolffe (1999). "p300 stimulates transcription instigated by ligand-bound thyroid hormone receptor at a step subsequent to chromatin disruption." *Embo J* **18**(20): 5634-52.
- Lieberman, P. M. and A. J. Berk (1994). "A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA--promoter DNA complex formation." *Genes Dev* **8**(9): 995-1006.
- Lin, A., J. Frost, T. Deng, T. Smeal, N. al-Alawi, U. Kikkawa, T. Hunter, D. Brenner and M. Karin (1992). "Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity [published erratum appears in Cell 1992 Nov 27;71(5):following 886]." *Cell* **70**(5): 777-89.
- Lin, Y. S., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg and M. R. Green (1991). "Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region." *Nature* **353**(6344): 569-71.
- Livingstone, C., G. Patel and N. Jones (1995). "ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain." *Embo J* **14**(8): 1785-97.
- Lu, H., J. Lin, J. Chen and A. J. Levine (1994). "The regulation of p53-mediated transcription and the roles of hTAFII31 and mdm-2." *Harvey Lect* **90**: 81-93.
- Lundblad, J. R., R. P. Kwok, M. E. Lurance, M. L. Harter and R. H. Goodman (1995). "Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP." *Nature* **374**(6517): 85-8.
- Madison, J. M., A. M. Dudley and F. Winston (1998). "Identification and analysis of Mot3, a zinc finger protein that binds to the retrotransposon Ty long terminal repeat (delta) in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **18**(4): 1879-90.
- Madison, J. M. and F. Winston (1997). "Evidence that Spt3 functionally interacts with Mot1, TFIIA, and TATA- binding protein to confer promoter-specific transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **17**(1): 287-95.
- Marcus, G. A., J. Horiuchi, N. Silverman and L. Guarente (1996). "ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, which are involved in yeast transcription." *Mol Cell Biol* **16**(6): 3197-205.
- Marcus, G. A., N. Silverman, S. L. Berger, J. Horiuchi and L. Guarente (1994). "Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors." *Embo J* **13**(20): 4807-15.

- May, G. H., K. E. Allen, W. Clark, M. Funk and D. A. Gillespie (1998). "Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo." J Biol Chem **273**(50): 33429-35.
- May, G. H., M. Funk, E. J. Black, W. Clark, S. Hussain, J. R. Woodgett and D. A. Gillespie (1998). "An oncogenic mutation uncouples the v-Jun oncoprotein from positive regulation by the SAPK/JNK pathway in vivo." Curr Biol **8**(2): 117-20.
- Mellgren, R. L. (1997). "Specificities of cell permeant peptidyl inhibitors for the proteinase activities of mu-calpain and the 20 S proteasome." J Biol Chem **272**(47): 29899-903.
- Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis and M. Karin (1994). "c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases." Mol Cell Biol **14**(10): 6683-8.
- Miner, J. N. and K. R. Yamamoto (1992). "The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element." Genes Dev **6**(12B): 2491-501.
- Mizzen, C. A., X. J. Yang, T. Kokubo, J. E. Brownell, A. J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S. L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani and C. D. Allis (1996). "The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity." Cell **87**(7): 1261-70.
- Mobley, C. M. and L. Sealy (1998). "Role of the transcription start site core region and transcription factor YY1 in Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter activity." J Virol **72**(8): 6592-601.
- Morgan, I. M., M. Asano, L. S. Havarstein, H. Ishikawa, T. Hiiragi, Y. Ito and P. K. Vogt (1993). "Amino acid substitutions modulate the effect of Jun on transformation, transcriptional activation and DNA replication." Oncogene **8**(5): 1135-40.
- Musti, A. M., M. Treier and D. Bohmann (1997). "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases." Science **275**(5298): 400-2.
- Musti, A. M., M. Treier, F. A. Peverali and D. Bohmann (1996). "Differential regulation of c-Jun and JunD by ubiquitin-dependent protein degradation." Biol Chem **377**(10): 619-24.

- Nakajima, T., C. Uchida, S. F. Anderson, C. G. Lee, J. Hurwitz, J. D. Parvin and M. Montminy (1997). "RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II." *Cell* **90**(6): 1107-12.
- Natarajan, K., B. M. Jackson, E. Rhee and A. G. Hinnebusch (1998). "yTAFII61 has a general role in RNA polymerase II transcription and is required by GCN4p to recruit the SAGA coactivator complex." *Mol Cell* **2**(5): 683-92.
- Naumann, M., D. Bech-Otschir, X. Huang, K. Ferrell and W. Dubiel (1999). "COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK." *J Biol Chem* **274**(50): 35297-300.
- Nead, M. A., L. A. Baglia, M. J. Antinore, J. W. Ludlow and D. J. McCance (1998). "Rb binds c-Jun and activates transcription." *Embo J* **17**(8): 2342-52.
- Nemoto, Y., T. Yamamoto, S. Takada, Y. Matsui and M. Obinata (1990). "Antisense RNA of the latent period gene (MER5) inhibits the differentiation of murine erythroleukemia cells." *Gene* **91**(2): 261-5.
- Nikolakaki, E., P. J. Coffey, R. Hemelsoet, J. R. Woodgett and L. H. Defize (1993). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells." *Oncogene* **8**(4): 833-40.
- Norton, V. G., B. S. Imai, P. Yau and E. M. Bradbury (1989). "Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change." *Cell* **57**(3): 449-57.
- Oehler, T. and P. Angel (1992). "A common intermediary factor (p52/54) recognizing "acidic blob"-type domains is required for transcriptional activation by the Jun proteins [published erratum appears in Mol Cell Biol 1993 Mar;13(3):1981]." *Mol Cell Biol* **12**(12): 5508-15.
- Oehler, T., A. Pintzas, S. Stumm, A. Darling, D. Gillespie and P. Angel (1993). "Mutation of a phosphorylation site in the DNA-binding domain is required for redox-independent transactivation of AP1-dependent genes by v-Jun." *Oncogene* **8**(5): 1141-7.
- Offringa, R., S. Gebel, H. van Dam, M. Timmers, A. Smits, R. Zwart, B. Stein, J. L. Bos, A. van der Eb and P. Herrlich (1990). "A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity." *Cell* **62**(3): 527-38.

- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell **87**(5): 953-9.
- Ohba, R., D. J. Steger, J. E. Brownell, C. A. Mizzen, R. G. Cook, J. Cote, J. L. Workman and C. D. Allis (1999). "A novel H2A/H4 nucleosomal histone acetyltransferase in *Tetrahymena thermophila*." Mol Cell Biol **19**(3): 2061-8.
- Papavassiliou, A. G., C. Chavrier and D. Bohmann (1992). "Phosphorylation state and DNA-binding activity of c-Jun depend on the intracellular concentration of binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11562-5.
- Papavassiliou, A. G., M. Treier and D. Bohmann (1995). "Intramolecular signal transduction in c-Jun." Embo J **14**(9): 2014-9.
- Papavassiliou, A. G., M. Treier, C. Chavrier and D. Bohmann (1992). "Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation- dependent signal on c-Jun." Science **258**(5090): 1941-4.
- Pariat, M., C. Salvat, M. Bebien, F. Brockly, E. Altieri, S. Carillo, I. Jariel-Encontre and M. Piechaczyk (2000). "The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers." Biochem J **345 Pt 1**: 129-38.
- Peverali, F. A., A. Isaksson, A. A. Papavassiliou, P. Plastina, L. M. Staszewski, M. Mlodzik and D. Bohmann (1996). "Phosphorylation of *Drosophila* Jun by the MAP kinase rolled regulates photoreceptor differentiation." Embo J **15**(15): 3943-50.
- Pfarr, C. M., F. Mechta, G. Spyrou, D. Lallemand, S. Carillo and M. Yaniv (1994). "Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras." Cell **76**(4): 747-60.
- Pfisterer, P., S. Zwilling, J. Hess and T. Wirth (1995). "Functional characterization of the murine homolog of the B cell- specific coactivator BOB.1/OBF.1." J Biol Chem **270**(50): 29870-80.
- Pina, B., S. Berger, G. A. Marcus, N. Silverman, J. Agapite and L. Guarente (1993). "ADA3: a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of ADA2." Mol Cell Biol **13**(10): 5981-9.
- Porte, D., J. Tuckermann, M. Becker, B. Baumann, S. Teurich, T. Higgins, M. J. Owen, M. Schorpp-Kistner and P. Angel (1999). "Both AP-1 and Cbfa1-like factors are

- required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone.” Oncogene **18**(3): 667-78.
- Prosperi, M. T., D. Ferbus, I. Karczinski and G. Goubin (1993). “A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins.” J Biol Chem **268**(15): 11050-6.
- Ptashne, M. and A. Gann (1997). “Transcriptional activation by recruitment.” Nature **386**(6625): 569-77.
- Pugh, B. F. and R. Tjian (1990). “Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators.” Cell **61**(7): 1187-97.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki and J. R. Woodgett (1991). “Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases.” Nature **353**(6345): 670-4.
- Ransone, L. J., L. D. Kerr, M. J. Schmitt, P. Wamsley and I. M. Verma (1993). “The bZIP domains of Fos and Jun mediate a physical association with the TATA box-binding protein.” Gene Expr **3**(1): 37-48.
- Ransone, L. J., J. Visvader, P. Sassone-Corsi and I. M. Verma (1989). “Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins.” Genes Dev **3**(6): 770-81.
- Rauscher, F. J. d., D. R. Cohen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian and B. R. Franza, Jr. (1988). “Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene.” Science **240**(4855): 1010-6.
- Roberts, S. G., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg and M. R. Green (1993). “Interaction between an acidic activator and transcription factor TFIIB is required for transcriptional activation.” Nature **363**(6431): 741-4.
- Roberts, S. M. and F. Winston (1997). “Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and GCN5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes.” Genetics **147**(2): 451-65.
- Rozek, D. and G. P. Pfeifer (1993). “In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response.” Mol Cell Biol **13**(9): 5490-9.
- Sabbah, M., D. Courilleau, J. Mester and G. Redeuilh (1999). “Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element.” Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11217-22.

- Sadowski, I., J. Ma, S. Triezenberg and M. Ptashne (1988). "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator." Nature **335**(6190): 563-4.
- Sanchez, I., R. T. Hughes, B. J. Mayer, K. Yee, J. R. Woodgett, J. Avruch, J. M. Kyriakis and L. I. Zon (1994). "Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun." Nature **372**(6508): 794-8.
- Sanders, S. L., E. R. Klebanow and P. A. Weil (1999). "TAF25p, a non-histone-like subunit of TFIID and SAGA complexes, is essential for total mRNA gene transcription in vivo." J Biol Chem **274**(27): 18847-50.
- Sarafian, T. A., C. Huang, A. Kim, J. de Vellis and H. Shau (1998). "Expression of the antioxidant gene NKEF in the central nervous system." Mol Chem Neuropathol **34**(1): 39-51.
- Sarafian, T. A., N. Rajper, B. Grigorian, A. Kim and H. Shau (1997). "Cellular antioxidant properties of human natural killer enhancing factor B." Free Radic Res **26**(3): 281-9.
- Sarafian, T. A., M. A. Verity, H. V. Vinters, C. C. Shih, L. Shi, X. D. Ji, L. Dong and H. Shau (1999). "Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types." J Neurosci Res **56**(2): 206-12.
- Sassone-Corsi, P., L. J. Ransone, W. W. Lamph and I. M. Verma (1988). "Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain." Nature **336**(6200): 692-5.
- Sauri, H., P. H. Ashjian, A. T. Kim and H. Shau (1996). "Recombinant natural killer enhancing factor augments natural killer cytotoxicity." J Leukoc Biol **59**(6): 925-31.
- Schonthal, A. and J. R. Feramisco (1990). "Different promoter elements are required for the induced expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes by the v-mos oncogene product." New Biol **2**(2): 143-50.
- Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel and E. F. Wagner (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." Genes Dev **13**(5): 607-19.
- Schroder, E., A. C. Willis and C. P. Ponting (1998). "Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro." Biochim Biophys Acta **1383**(2): 279-91.

- Schule, R., P. Rangarajan, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, N. Yang, I. M. Verma and R. M. Evans (1990). "Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor." *Cell* **62**(6): 1217-26.
- Sealy, L. and R. Chalkley (1978). "DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I." *Nucleic Acids Res* **5**(6): 1863-76.
- Seol, D. W., Q. Chen and R. Zarnegar (2000). "Transcriptional activation of the hepatocyte growth factor receptor (c- met) gene by its ligand (hepatocyte growth factor) is mediated through AP-1." *Oncogene* **19**(9): 1132-7.
- Shau, H., L. H. Butterfield, R. Chiu and A. Kim (1994). "Cloning and sequence analysis of candidate human natural killer- enhancing factor genes." *Immunogenetics* **40**(2): 129-34.
- Shau, H., R. K. Gupta and S. H. Golub (1993). "Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells." *Cell Immunol* **147**(1): 1-11.
- Siow, R. C., T. Ishii, H. Sato, S. Taketani, D. S. Leake, J. H. Sweiry, J. D. Pearson, S. Bannai and G. E. Mann (1995). "Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidised LDL in cultured vascular smooth muscle cells." *FEBS Lett* **368**(2): 239-42.
- Sistonen, L., E. Holttä, H. Lehvaslaiho, L. Lehtola and K. Alitalo (1989). "Activation of the neu tyrosine kinase induces the fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase." *J Cell Biol* **109**(5): 1911-9.
- Sluss, H. K., T. Barrett, B. Derijard and R. J. Davis (1994). "Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases." *Mol Cell Biol* **14**(12): 8376-84.
- Smeal, T., B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer and M. Karin (1991). "Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73." *Nature* **354**(6353): 494-6.
- Smith, S. E., A. G. Papavassiliou and D. Bohmann (1993). "Different TRE-related elements are distinguished by sets of DNA-binding proteins with overlapping sequence specificity." *Nucleic Acids Res* **21**(7): 1581-5.
- Spencer, T. E., G. Jenster, M. M. Burcin, C. D. Allis, J. Zhou, C. A. Mizzen, N. J. McKenna, S. A. Onate, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1997). "Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase." *Nature* **389**(6647): 194-8.

- Steff, A. M., S. Carillo, M. Pariat and M. Piechaczyk (1997). "Decreased susceptibility to calpains of v-FosFBR but not of v-FosFBJ or v-JunASV17 retroviral proteins compared with their cellular counterparts." Biochem J **323**(Pt 3): 685-92.
- Sterner, D. E., P. A. Grant, S. M. Roberts, L. J. Duggan, R. Belotserkovskaya, L. A. Pacella, F. Winston, J. L. Workman and S. L. Berger (1999). "Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA- binding protein interaction." Mol Cell Biol **19**(1): 86-98.
- Stringer, K. F., C. J. Ingles and J. Greenblatt (1990). "Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID." Nature **345**(6278): 783-6.
- Struhl, K. (1988). "The JUN oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast." Nature **332**(6165): 649-50.
- Suzuki, K., H. Sorimachi, T. Yoshizawa, K. Kinbara and S. Ishiura (1995). "Calpain: novel family members, activation, and physiologic function." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(9): 523-9.
- Suzuki, T., M. Murakami, N. Onai, E. Fukuda, Y. Hashimoto, M. H. Sonobe, T. Kameda, M. Ichinose, K. Miki and H. Iba (1994). "Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways." J Virol **68**(6): 3527-35.
- Swope, D. L., C. L. Mueller and J. C. Chrivia (1996). "CREB-binding protein activates transcription through multiple domains." J Biol Chem **271**(45): 28138-45.
- Takeda, J., H. Yano, S. Eng, Y. Zeng and G. I. Bell (1993). "A molecular inventory of human pancreatic islets: sequence analysis of 1000 cDNA clones." Hum Mol Genet **2**(11): 1793-8.
- Tasset, D., L. Tora, C. Fromental, E. Scheer and P. Chambon (1990). "Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms." Cell **62**(6): 1177-87.
- Teurich, S. and P. Angel (1995). "The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites." Chem Senses **20**(2): 251-5.
- Theill, L. E., J. L. Castrillo, D. Wu and M. Karin (1989). "Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1." Nature **342**(6252): 945-8.

- Thut, C. J., J. L. Chen, R. Klemm and R. Tjian (1995). "p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60." *Science* **267**(5194): 100-4.
- Treier, M., D. Bohmann and M. Mlodzik (1995). "JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the Drosophila eye." *Cell* **83**(5): 753-60.
- Treier, M., L. M. Staszewski and D. Bohmann (1994). "Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain." *Cell* **78**(5): 787-98.
- Uesugi, M., O. Nyanguile, H. Lu, A. J. Levine and G. L. Verdine (1997). "Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF." *Science* **277**(5330): 1310-3.
- Utlej, R. T., K. Ikeda, P. A. Grant, J. Cote, D. J. Steger, A. Eberharter, S. John and J. L. Workman (1998). "Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes." *Nature* **394**(6692): 498-502.
- van Dam, H., S. Huguier, K. Kooistra, J. Bague, E. Vial, A. J. van der Eb, P. Herrlich, P. Angel and M. Castellazzi (1998). "Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun- controlled genetic programs of cellular transformation." *Genes Dev* **12**(8): 1227-39.
- van Dam, H., R. Offringa, I. Meijer, B. Stein, A. M. Smits, P. Herrlich, J. L. Bos and A. J. van der Eb (1990). "Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family." *Mol Cell Biol* **10**(11): 5857-64.
- van Dam, H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich and P. Angel (1995). "ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents." *Embo J* **14**(8): 1798-811.
- Van Hoy, M., K. K. Leuther, T. Kodadek and S. A. Johnston (1993). "The acidic activation domains of the GCN4 and GAL4 proteins are not alpha helical but form beta sheets [see comments]." *Cell* **72**(4): 587-94.
- Verrijzer, C. P. and R. Tjian (1996). "TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity [see comments]." *Trends Biochem Sci* **21**(9): 338-42.
- Vignali, M., D. J. Steger, K. E. Neely and J. L. Workman (2000). "Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes." *Embo J* **19**(11): 2629-2640.

- Vinitzky, A., C. Michaud, J. C. Powers and M. Orlowski (1992). "Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex." Biochemistry **31**(39): 9421-8.
- Vogt, P. K., T. J. Bos and R. F. Doolittle (1987). "Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3316-9.
- Wang, C. H., Y. P. Tsao, H. J. Chen, H. L. Chen, H. W. Wang and S. L. Chen (2000). "Transcriptional repression of p21((Waf1/Cip1/Sdi1)) gene by c-jun through Sp1 site." Biochem Biophys Res Commun **270**(1): 303-10.
- Wang, H., Z. Xie and R. E. Scott (1996). "Differentiation modulates the balance of positive and negative Jun/AP-1 DNA binding activities to regulate cellular proliferative potential: different effects in nontransformed and transformed cells." J Cell Biol **135**(4): 1151-62.
- Wasylyk, B. (1988). "Enhancers and transcription factors in the control of gene expression." Biochim Biophys Acta **951**(1): 17-35.
- Wasylyk, C., J. L. Imler and B. Wasylyk (1988). "Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1." Embo J **7**(8): 2475-83.
- Wen, S. T. and R. A. Van Etten (1997). "The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity." Genes Dev **11**(19): 2456-67.
- Wilhelm, D., K. Bender, A. Knebel and P. Angel (1997). "The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents." Mol Cell Biol **17**(8): 4792-800.
- Wisdom, R. (1999). "AP-1: one switch for many signals." Exp Cell Res **253**(1): 180-5.
- Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." Embo J **9**(8): 2431-8.
- Workman, J. L. and R. E. Kingston (1998). "Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation." Annu Rev Biochem **67**: 545-79.
- Xanthoudakis, S. and T. Curran (1992). "Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity." Embo J **11**(2): 653-65.

- Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y. C. Pan and T. Curran (1992). "Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme." Embo J **11**(9): 3323-35.
- Xiao, H., A. Pearson, B. Coulombe, R. Truant, S. Zhang, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, D. Reinberg, O. Flores, C. J. Ingles and et al. (1994). "Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53." Mol Cell Biol **14**(10): 7013-24.
- Yamamoto, T., Y. Matsui, S. Natori and M. Obinata (1989). "Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells." Gene **80**(2): 337-43.
- Yang, X. J., V. V. Ogryzko, J. Nishikawa, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996). "A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A." Nature **382**(6589): 319-24.
- Ye, J., X. Zhang and Z. Dong (1996). "Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene promoter: an AP1 complex and an Sp1-related complex transactivate the promoter activity that is suppressed by a YY1 complex." Mol Cell Biol **16**(1): 157-67.
- Yim, M. B., H. Z. Chae, S. G. Rhee, P. B. Chock and E. R. Stadtman (1994). "On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules." J Biol Chem **269**(3): 1621-6.
- Zhang, W., J. R. Bone, D. G. Edmondson, B. M. Turner and S. Y. Roth (1998). "Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the GCN5p acetyltransferase." Embo J **17**(11): 3155-67.
- Zhang, Y., L. Zhou and C. A. Miller (1998). "A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2586-91.

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Abteilung Signaltransduktion und Wachstumskontrolle angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Peter Angel für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die herausragende Betreuung. Seine unermüdliche Bereitschaft, Ergebnisse und Probleme zu diskutieren und seine hilfreiche Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Dirk Bohmann und Prof. Dr. Ekkehard Bautz danke ich herzlich für die Übernahme des Referats.

Alex Pintzas, Laszlo Tora und Irwin Davidson danke ich für die stets kooperative und interessante wissenschaftliche Zusammenarbeit. Irwin Davidson danke ich besonders für die Bereitstellung des hTAFII55 spezifischen Antikörpers.

Mein Dank gilt auch insbesondere Sandra Weich, die mich durch die ersten zwei Jahre begleitet hat und mir immer mit ihrer Freundschaft und Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Sonja Marchetti, die Dank ihres sonnigen Wesens für eine sehr angenehme Atmosphäre sorgte.

Ute Breitenbach, Marina Schorp-Kistner, Jochen Heß, Sven Andrecht und Axel Szabowski danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit.

Sibylle Teurich danke ich für die Hilfe in einer schwierigen Zeit, in der sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich durch guten Rat unterstützt hat.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an Melanie Sator-Schmitt und Susanne Adams, die sich immer durch eine ausgesprochene Hilfsbereitschaft auszeichneten.

Niamh Keon, Ute Breitenbach und Dirk Schmidt gilt ein besonderer Dank. Sie waren mir gute Freunde.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Angel-Arbeitsgruppe, die mich durch diese Zeit begleitet haben und für eine stets anregende Atmosphäre sorgten.