

**Identifikation von positiven und negativen Funktionen
des Transkriptionsfaktors JunB bei der
Zellzyklusregulation**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Sven Andrecht
geboren am 17. April 1972, in Neustadt a. Rbge.

2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1	3
2.1.1. Die Regulation von AP-1	5
2.1.2. Die Rolle von AP-1 bei der Proliferation	9
2.2. Der Zellzyklus	10
2.2.1. Die aktivierenden Regulatoren des Zellzyklus	11
2.2.2. Die Inhibitoren des Zellzyklus	13
2.3. Fragestellung	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Material	16
3.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	16
3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial	18
3.1.3. Enzyme	19
3.1.4. Radiochemikalien	19
3.1.5. Antikörper	19
3.1.6. Proben für Northern-Blot Analysen	20
3.1.7. Oligonukleotide für Protein/DNA-Bindungsstudien	20
3.1.8. Oligonukleotide für die PCR	20
3.1.9. Nährmedien für die Bakterienkultur	21
3.1.10. Lösungen und Puffer	21
3.1.11. Bakterienstämme	21
3.1.12. Zellen	22
3.2. DNA-Methoden	23
3.2.1. Allgemeine DNA-Techniken	23
3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR)	28
3.2.3. Sequenzierung von DNA	28
3.2.4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	29
3.2.5. Transformation von DNA in <i>E.coli</i> Bakterien	30

3.3. RNA-Methoden	31
3.3.1. Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski u. Sacchi, 1987)	31
3.3.2. RT-PCR	31
3.3.3. Gelelektrophorese von RNA	32
3.3.4. Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)	32
3.3.5. Hybridisierung der RNA	32
3.4. Protein-Methoden	33
3.4.1. Herstellung von Proteinextrakten	33
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951)	33
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.4.4. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen	35
3.4.5. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	35
3.4.6. Immunpräzipitation von Proteinen	36
3.4.7. <i>in vitro</i> Kinase-Aktivitätsbestimmung	36
3.4.8. Bestimmung der Chloramphenicol-Azetyltransferase-Aktivität („CAT-Assay“)	37
3.4.9. Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen	38
3.4.10. DNA/Protein-Bindungsstudien (EMSA)	39
3.4.11. Luziferase- und LacZ-Bestimmung	40
3.5. Zellkultur	41
3.5.1. Trypsinieren von Zellen	41
3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.5.3. Synchronisation der Zellen in der G ₀ /G ₁ -Phase	42
3.5.4. Synchronisation der Zellen in der S-Phase	42
3.5.5. Behandlung der Zellen mit TPA	42
3.5.6. Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen	42
3.6. FACS-Analyse	43
3.6.1. Detektion von DNA mittels FACS	43
3.6.2. Detektion von BrdU mittels FACS	43
3.7. Immunhistologische Bestimmung der S-Phase-Zellen	44

4. Ergebnisse	45
4.1. <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten zeigen eine normale Proliferation	45
4.2. Verändertes Zellzyklusprofil in den JunB-defizienten Fibroblasten	47
4.3. Verstärkte Aktivität von Zyklin D-abhängigen Kinase-Komplexen in der G ₁ -Phase	50
4.4. Die Transkript- und Proteinmenge des Zellzyklus-Inhibitors p16 ^{Ink4a} ist in Abwesenheit von JunB reduziert	52
4.5. Reduzierte Expression von p53 und veränderte Aktivierungskinetik von c-Jun in den JunB-defizienten Fibroblasten	54
4.6. Verlangsamtes Durchlaufen der S/G ₂ /M-Phasen in den <i>junB</i> ^{-/-} -Fibroblasten	55
4.7. Reduzierte Aktivität von Zyklin A- und Zyklin B-abhängigen Kinase-Komplexen in den S/G ₂ /M-Phasen	57
4.8. JunB verstärkt die Transkription am <i>Zyklin A</i> -Promotor	59
4.9. Die Überexpression von JunB führt zu einer verlangsamten Proliferation und einem Anstieg der p16 ^{Ink4a} -Expression	63
4.10. Ein posttranslational-aktivierbares JunB-ER-Protein revertiert die Zellzyklus-Defekte in den JunB-defizienten Fibroblasten	64
5. Diskussion	70
5.1. Die Rolle von JunB im G ₁ /S-Übergang	70
5.2. Die Rolle von JunB im S/G ₂ /M-Übergang	74
5.3. Der Verlust von JunB verursacht die Zellzyklusdefekte	77
5.4. Duale Rolle von JunB in der Zellzyklusregulation	78
6. Ausblick	80
7. Literaturverzeichnis	82
8. Anhang	96

1. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor AP-1, ein Sammelbegriff für gleichzeitig in der Zelle vorkommende Proteindimere aus den strukturell nahe verwandten Produkten der *Jun*-, *Fos*- und *ATF*-Genfamilien, stellt einen wichtigen Endpunkt mitogen- und stress-aktivierter Signaltransduktionskaskaden dar. Somit greift AP-1 entscheidend in die Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Transformation und programmiertem Zelltod (Apoptose) ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die bis dahin unbekannt Aufgaben der AP-1-Untereinheit JunB bei der Zellproliferation zu definieren. Dazu wurden Fibroblasten aus E9.5 p.c. Maus-embryonen isoliert, in denen das *junB*-Gen gezielt inaktiviert worden ist. Diese primären als auch davon abgeleitete immortalisierte Fibroblasten sind in ihrer Proliferation insgesamt nicht verändert. Allerdings kommt es durch den Verlust repressorischer JunB-Funktionen zu einer verlängerten c-Jun-Aktivierung, zur De-Repression von Zyklin D1 und somit insgesamt zur früheren Induktion des Zyklin D1-Promotors. Das Fehlen von aktivierenden Funktionen hat zudem eine stark verminderte Expression des zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors p16^{INK4a} zur Folge. Obwohl all diese Veränderungen letztlich dazu beitragen, daß *junB*^{-/-}-Fibroblasten deutlich schneller von der G₁- in die S-Phase übergehen, sorgt eine Verlangsamung am S/G₂/M-Übergang aufgrund verminderter, zeitlich verzögert auftretender Aktivitäten von Zyklin A-CDK2 und Zyklin B-CDC2 dafür, daß die Proliferationsrate in den *junB*^{-/-}-Fibroblasten nicht verändert ist. Promotorstudien und Koexpressionsexperimente führten zur Identifizierung von Zyklin A als zweitem Zellzyklusregulator neben p16^{INK4a}, dessen transkriptionelle Aktivierung JunB-abhängig ist.

Die beobachteten molekularen Veränderungen in *junB*^{-/-}-Fibroblasten während des Zellzyklusdurchlaufs werden ausschließlich durch den Verlust von JunB hervorgerufen, denn sie können durch das Wiedereinbringen eines aktivierbaren JunB-ERTM- Proteins revertiert werden. Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz mit genetisch veränderten *junB*^{-/-}-Zellen liefert die wertvolle Erkenntnis, daß einzigartige positive und auch negative Funktionen von JunB für eine geordnete Zellzyklus-Progression notwendig sind und stellt eine entscheidende Verbindung zwischen JunB-Funktion und Zellzyklusregulation her.

Schlagwörter: JunB / Zellzyklus / Zyklin A

1. Summary

The transcription factor AP-1, composed of dimeric protein complexes, which consist of structurally related members of the *jun*, *fos* and *ATF* gene families, is at the receiving end of mitogen- and stress-activated signal transduction cascades. Thus, AP-1 is implicated in the regulation of important cellular processes such as proliferation, differentiation, transformation and programmed cell death (apoptosis).

Aim of the presented work was to define the yet unknown role of the AP-1 subunit JunB in cell proliferation using *junB*^{-/-} fibroblasts derived from E9.5 p.c. mouse embryos with a targeted mutation in the *junB* gene. For the time being, primary as well as subsequently derived immortal fibroblasts were not altered in proliferation. However, loss of JunB repressor functions leads to prolonged c-Jun activation and concomitantly, to a de-repression and a premature induction of the cyclin D1 promoter. The lack of JunB-dependent activating functions results in a strongly decreased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a}. Despite the accelerated G₁- to S-phase transition, *junB*^{-/-} cells do not exhibit an enhanced proliferation rate, because it is compensated by a deceleration at the S to G₂/M transition. This phenotype is caused by delayed and diminished activities of cyclin A-CDK2 and cyclinB-CDC2. Promoter as well as co-expression studies led to the identification of Cyclin A as second cell cycle regulator in addition to p16^{INK4a} whose expression is regulated in a JunB-dependent manner.

The observed molecular alterations in cell cycle progression of *junB*^{-/-} fibroblasts are solely caused by the lack of JunB since they can be reverted upon reintroduction of an inducible JunB-ERTM protein. The approach applied in this work yielded valuable insights eliciting unique positive as well as negative regulatory functions of JunB for proper cell cycle progression and provides evidence for a direct link between JunB function and cell cycle regulation.

key words: JunB / cell cycle / cyclin A

2. Einleitung

Biologische Prozesse wie Proliferation und Differenzierung werden in einem vielzelligen eukaryontischen Organismus durch die differentielle Expression spezifischer Gene als Antwort auf extrazelluläre Stimuli reguliert. Zu diesen Stimuli gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Tumor-Promotoren und DNA-schädigende Agenzien. Sie interagieren direkt mit der DNA bzw. binden an membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren und lösen Signaltransduktionskaskaden bis in den Zellkern aus. Bestandteile dieser Signalketten sind Enzyme wie Kinasen und Phosphatasen, die im Zellkern zur Aktivierung bzw. Reprimierung von spezifisch DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren führen.

2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Genen spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein-1), da er die oben angeführten extrazellulären Stimuli in eine veränderte Genexpression umsetzt (Angel et al., 1987b; Lee et al., 1987a,b; Angel und Karin, 1991; Angel und Herrlich, 1994; Karin et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus Proteindimeren, die sich bei Säugetieren aus einer Kombination der verschiedenen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF- Proteinfamilien zusammensetzen. Die Familie der Jun-Proteine besteht aus c-Jun, JunB und JunD; die der Fos-Familie aus c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, und die der ATF-Familie aus ATF2, ATF3/LRF1, ATFa und B-ATF (als Übersicht Vogt und Bos, 1990; Angel und Karin, 1991; Goetz et al., 1996; Karin et al., 1997). Durch Mutationsanalysen wurden konservierte charakteristische Eigenschaften zwischen diesen Proteinen entdeckt, die zur Einordnung in die bZip-Proteinfamilie geführt hat (Landschulz et al., 1988). Die bZip-Region besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten, der basischen Region und dem sogenannten „Leucine-Zipper“. Die aus 12 bis 14 basischen Aminosäuren zusammengesetzte basische Region ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich (Vogt und Bos, 1990), während die „Leucine-Zipper“ Region für die Dimerisierung der AP-1-Untereinheiten benötigt wird.

Die Proteine der Jun-Familie können sowohl Heterodimere mit Mitgliedern der Fos- und ATF-Familie als auch Homodimere 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). Ähnliches gilt für die Mitglieder der ATF-Familie, die ebenfalls Hetero- und Homodimere bilden können (Ziff, 1990; Hai und Curran, 1991). Aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften ihres „Leucine-Zippers“ können die Mitglieder der Fos-Familie keine Homodimere bilden. Da die Proteindimerisierung aber Voraussetzung für die DNA-Bindung ist, können sie nicht alleine an die DNA binden. Durch die vielfältigen Möglichkeiten einer Dimerisierung der Mitglieder der AP-1-Familie ergeben sich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten. Die Spezifität, mit der die Dimere an die DNA binden, und auch ihre Funktion ist dabei abhängig von der Dimer-Zusammensetzung (Hai und Curran, 1991).

Die DNA-Konsensussequenz, an die die verschiedenen AP-1-Komplexe binden, ist das sogenannte TRE („TPA responsive element“, TGA_c^cTCA), welches ursprünglich in der Promotor-Region des menschlichen Kollagenase-Gens definiert wurde (Angel et al., 1987a,b). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die funktionelle TREs in ihren Promotorsequenzen

aufweisen. Sie kodieren unter anderem für Wachstumsfaktoren (z.B. *NGF*, Hengerer et al., 1990), Metalloproteinasen (z.B. *Kollagenase*, Angel et al., 1987a; *Stromelysin*, Kerr et al., 1988; *Urokinase*, Nerlov et al., 1991; *MMP-9*, Gum et al., 1996; Crowe und Brown, 1999), Transkriptionsfaktoren (z.B. *Fra-1*, Bergers et al., 1995), Zellzyklusregulatoren (z.B. *Zyklin D1*, Albanese et al., 1999; Sabbah et al., 1999; Bakiri et al., 2000; *p53*, Schreiber et al., 1999; *p16^{INK4a}*, Passegue und Wagner, 2000) und zelltypspezifische Genprodukte (z.B. *Keratin 18*, Oshima et al., 1990; Pankov et al., 1994; Rhodes und Oshima, 1998; *Involucrin*, Ng et al., 2000; Phillips et al., 2000). Der *c-jun*-Promotor enthält ebenfalls TRE-ähnliche DNA-Sequenzen, an die bevorzugt c-Jun/ATF-Heterodimere oder ATF-Homodimere binden (Benbrook und Jones, 1990; van Dam et al., 1993; Herr et al., 1994; Angel et al., 1988b). Diese c-Jun/AP-1 DNA-Sequenzen besitzen im Zentrum ein zusätzliches Basenpaar (Jun1: TGACATCA; Jun2: TTACCTCA).

Aufgrund der DNA-Bindenspezifität und der Fähigkeit zur Dimerisierung mit Jun oder Fos wurden weitere bZIP-Proteine identifiziert (als Übersicht Karin, et al., 1997): die Maf-Proteine (v-Maf, c-Maf), das Genprodukt des neuronalen retinaspezifischen Gens (Nishizawa, et al., 1989; Swaroop et al., 1992), sowie die beiden Jun-Dimerisierungspartner JDP1 und JDP2 (Aronheim et al., 1997).

Für den direkten oder indirekten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie weisen die AP-1-Proteine eine dritte funktionelle Domäne auf, die Transaktivierungsdomäne, die maßgeblich die Transkriptionsrate des Zielgens beeinflusst (Angel und Karin, 1991).

2.1.1. Die Regulation von AP-1

Die Regulation von AP-1 geschieht auf verschiedenen Ebenen. Bei der transkriptionellen Aktivierung und der posttranslationalen Modifikation sind extrazelluläre Signale, die innerhalb der Zelle Signaltransduktionskaskaden aktivieren, von entscheidender Bedeutung. Wichtiger Bestandteil dieser Signalketten sind Kinasen und Phosphatasen, die im Zellkern zu einer Aktivierung bzw. Reprimierung des Transkriptionsfaktors führen (Karin und Smeal, 1992; Karin, 1994).

Die Signaltransduktionswege können durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie dem EGF- und bFGF-Rezeptor (Aho et al., 1997; Sachsenmaier et al., 1994) oder von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie der Parathormon/Parathormon-verwandtes-Peptid-Rezeptor (PTH/PTHrP-Rezeptor; Clohisy et al., 1992) ausgelöst werden. Die Rezeptoraktivierung führt unter anderem zur Freisetzung des Botenstoffes Diacylglycerol (DAG), der seinerseits die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Außer DAG sind Phorbolster, die stark tumorpromovierende Agenzien darstellen, wie das 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat (TPA) effiziente Aktivatoren der PKC, weswegen die Behandlung von Zellen mit TPA zumindest teilweise die Wirkung von Serum- und Wachstumsfaktoren imitiert.

Die PKC wirkt als Serin/Threonin-Kinase und aktiviert eine Vielzahl von Substraten. Die Phosphorylierung der Proteinkinase Raf-1 (Marais et al., 1998), die durch das GTP-bindende-Protein Ras an die Zellmembran rekrutiert wird (Leevers et al., 1994), steht am Anfang einer Proteinphosphorylierungskaskade, in deren Verlauf die MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinases“) induziert werden (Marshall, 1995; Cano und Mahadevan, 1995). Zu der Familie der MAP-Kinasen gehören ERK1 und ERK2, Jun N-terminale Kinasen (JNK, auch als SAPK bezeichnet, mit mindestens zehn verschiedenen Isoformen) und p38 (Minden und

Karin, 1997). ERK1 und ERK2 („extracellular signal-regulated protein kinase“) modifizieren hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren TCF („ternary complex factor“) und Elk-1, die JNKs phosphorylieren die Transaktivierungsdomänen von c-Jun und ATF-2 (Karin, 1995; Karin und Hunter, 1995), während p38 ATF-2 und den Transkriptionsfaktor Max (Kyriakis und Avruch, 1996) aktiviert. Die Phosphorylierung von c-Jun, ATF-2 und TCF führt zur raschen Expression des *c-jun*-, *junB*- bzw. *c-fos*-Gens („immediate early genes“) und zur anschließenden Modulierung von AP-1-Zielgenen (Karin et al., 1997).

Neben der PKC-Signaltransduktionskaskade gibt es die der Proteinkinase A (PKA) als weiteren wichtigen Signalweg in der Zelle. Die Induktion der PKA-Kaskade durch den sekundären Botenstoff cAMP führt im Zellkern zur Regulation von Genen, die ein sogenanntes „cAMP responsive element“ (CRE; TGACGTCA) in ihrem Promotor aufweisen. An diese CRE-Erkennungssequenz binden hauptsächlich Proteine der CREB-Proteinfamilie. Die PKA- und die PKC-Signaltransduktionskaskade üben zumeist antagonistische Funktionen aus wie bei dem *c-jun*-Promotor, sie können aber auch synergistisch interagieren wie zum Beispiel am *junB*-Promotor (Karin und Smeal, 1992).

Neben der Regulation des Transaktivierungspotentials beeinflusst die posttranslationelle Modifikation der AP-1-Untereinheiten auch die Halbwertszeit der Proteine. Die Phosphorylierungen der Serine 63 und 73 in c-Jun durch JNKs sind wichtig für eine verstärkte Transaktivierung (Smeal et al., 1991; Smeal et al., 1992), aber ebenso für eine Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins (Treier et al., 1994). Für JunB wird angenommen, daß eine Phosphorylierung der Serine 23 und 186 und des Threonins 150 durch p34^{cdc2} während der Mitose zu einer Degradierung des Proteins führt (Bakiri et al., 2000). Durch die posttranslationelle Modifikationen kann desweiteren auch die Affinität der Proteine zur DNA reguliert werden. So führt die Dephosphorylierung von Serinen und Threoninen (Serin 243 und 249, sowie Threonin 231 und 239) in der DNA-Bindedomäne von c-Jun zu einer erhöhten DNA-Bindungsaffinität (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992).

Weitere Möglichkeiten der Regulation von AP-1 sind Protein-Protein-Wechselwirkungen (Karin, et al., 1997). So hemmen sich MyoD und c-Jun gegenseitig durch direkte Interaktion (Su et al., 1991; Li et al., 1992; Bengal et al., 1992), während NF- κ B und AP-1 synergistisch wirken können (Stein et al., 1993). Ein weiteres mit AP-1 interagierendes Protein ist der Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Dieser ist nach der Aktivierung in der Lage, die c-Jun/c-Fos-vermittelte TPA-induzierte Transaktivierung der Kollagenase zu hemmen (Jonat et al., 1990; Yang Yen et al., 1990; Schüle et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Dabei ist der Mechanismus der Hemmung unabhängig von der Bindung des GR an die DNA (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999).

Die Regulation der individuellen Familienmitglieder, die sich nicht nur in ihrer Transaktivierungsspezifität und Bindungsaffinität unterscheiden, sowie ihre Funktionen können durch unterschiedliche experimentelle Ansätze, wie Überexpression der einzelnen Proteine oder das Einsetzen von dominant-negativ-wirkenden Mutanten, untersucht werden. Zur Bestimmung der individuellen Aufgaben der einzelnen AP-1-Mitglieder wurden jedoch die jeweiligen Gene spezifisch mit Hilfe der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ausgeschaltet („knock out“). Dieser Ansatz hat gezeigt, daß die einzelnen Mitglieder der AP-1-Familie sehr spezifische Funktionen ausüben. Die Expression von c-Jun, JunB und Fra 1 sind lebensnot-

wendig, da Embryonen, die die jeweiligen Proteine nicht exprimieren, während ihrer pränatalen Entwicklung aufgrund unterschiedlicher Defekte sterben (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993; Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind *c-Fos*-, *ATF2*-, *FosB*- oder *JunD*-defiziente Mäuse lebensfähig, zeigen aber auch individuelle phänotypische Veränderungen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Reimold et al., 1996; Gruda et al., 1996; Thepot et al., 2000). *FosB*-defiziente Mäuse weisen ein verändertes Verhalten bei der Aufzucht und Pflege ihrer Nachkommen auf (Brown et al., 1996). Männliche *JunD*^{-/-}-Mäuse haben altersabhängige Defekte in den Reproduktionsorganen (Thepot et al., 2000). *ATF2*^{-/-}-Mäuse zeigen Defekte im Zentralnervensystem und der endochondrialen Ossifikation, während *c-fos*^{-/-}-Mäuse Osteopetrose entwickeln, da es zu keiner terminalen Differenzierung von Osteoklasten kommt (Johnson, et al., 1992; Wang, et al., 1992; Reimold, et al., 1996; Grigoriadis et al., 1994). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die einzelnen Mitglieder der Jun-, Fos- und ATF-Familie essentiell für spezifische biologische Prozesse sind und nicht redundante Funktionen haben.

2.1.2. Die Rolle von AP-1 bei der Proliferation

Durch mehrere unabhängige experimentelle Ansätze wurde herausgefunden, daß AP-1 entscheidend an der Regulation der Proliferation beteiligt ist. So führt eine Stimulation von Zellen, die durch Entzug von Wachstumsfaktoren in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert worden sind, zu einer schnellen Induktion der frühen, sogenannten „immediate early“ Gene (Angel und Karin, 1991). Die Expression der *c-jun*-RNA in logarithmisch wachsenden Zellen ist im Vergleich zu G₀-arretierten Zellen verstärkt (Angel et al., 1988b; Ryseck et al., 1988) und die Mikroinjektionen von Antikörpern gegen AP-1-Mitglieder oder der Einsatz von „antisense“-RNA führen zu einer verminderten DNA-Synthese und arretieren die Zellen in der G₀/G₁-Phase (Kovary und Bravo, 1991; Riabowol et al., 1992; Smith und Prochownik, 1992). Desweiteren zeigen *c-Jun*-überexprimierende Zellen einen schnelleren Übergang von der G₁- in die S-Phase, was zu einer vergrößerten S/G₂-Phase-Population führt. Im Gegensatz dazu verlangsamt die Überexpression von *JunD* die Proliferation und vergrößert die G₀/G₁-Phase-Population (Pfarr et al., 1994).

Ein weiterer Hinweis, daß AP-1 in der Proliferation eine wichtige Rolle spielt, hat sich bei der Analyse von *c-Jun*-defizienten Fibroblasten ergeben. Diese Fibroblasten proliferieren langsamer aufgrund einer veränderten Transkription der *c-Jun*-abhängigen Zellzyklus-Regulatoren p53 und Zyklin D1 (Schreiber et al., 1999; Wisdom et al., 1999).

Über die Rolle von *JunB* im Prozeß der Proliferation ist dagegen noch sehr wenig bekannt. *In vitro* Transfektions- und Transformationsstudien haben bisher nur gezeigt, daß *JunB* sowohl die *c-Jun*-vermittelte Transformation als auch die *c-Jun*-abhängige Transaktivierung von Promotoren mit einer AP-1-Bindungsstelle hemmt und damit die *c-Jun*-abhängige AP-1-Aktivität negativ reguliert (Chiu et al., 1989; Schütte et al., 1989; Deng und Karin, 1993). Im Gegensatz dazu kann *JunB* aber artifizielle und natürliche Promotoren mit multiplen AP-1-Bindungsstellen transaktivieren wie zum Beispiel bei dem Wachstumshormon-verwandten, angiogenetisch wirkenden Peptid Proliferin (Chiu et al., 1989; Groskopf und Linzer, 1994; Schorpp-Kistner et al., 1999).

In der Primärstruktur unterscheidet sich JunB von c-Jun durch eine kleine Anzahl von Aminosäureaustauschen in der DNA-Bindungs- und der Dimerisierungs-Domäne. Diese Veränderungen haben zur Folge, daß JunB nur mit niedriger Effizienz Homodimere, sondern vielmehr Heterodimere mit c-Jun bildet, die nicht so effizient an die DNA binden wie c-Jun-Homodimere (Deng und Karin, 1993). Da die Heterodimere gegenüber den c-Jun-Homodimeren bevorzugt gebildet werden, kann die c-Jun-Transaktivierung durch vorhandenes JunB gehemmt werden. Zusammen mit Expressionsstudien während der Organentwicklung im Mausembryo, die eine unterschiedliche gewebsspezifische Expression für JunB und c-Jun festgestellt haben (Wilkinson et al., 1989), deuten diese Daten darauf hin daß die beiden Proteine trotz ihres hohen Verwandtschaftsgrads unterschiedliche Funktionen besitzen. Besonders deutlich werden diese unterschiedlichen Funktionen bei der Analyse der c-Jun- bzw. JunB-defizienten Mausembryonen. Die c-Jun-defizienten Embryonen sterben an Tag 13.5 p.c. ihrer Embryonalentwicklung durch Defekte in der Leber- und Herzentwicklung (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Im Gegensatz dazu sind die JunB-defizienten Embryonen stark wachstumsretardiert und sterben aufgrund von vaskulo- und angiogenetischen Defekten bei der Plazentaentwicklung zwischen Tag 8.5 und Tag 10 p.c. der Embryonalentwicklung (Schorpp-Kistner et al., 1999). Dieses Ergebnis macht deutlich, daß eine Komplementation von JunB durch c-Jun zumindest bei diesen Prozessen nicht möglich ist.

Die postulierten, nicht redundanten Funktionen von JunB in biologischen Prozessen und die Tatsache, daß JunB hemmend auf das in den Zellzyklus eingreifende Protein c-Jun wirkt, deuten darauf hin, daß JunB einen Einfluß auf die Regulation der Proliferation und des Zellzyklus besitzt.

2.2. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen läßt sich vereinfacht in vier Abschnitte einteilen: G_1 - („Gap“=Lücke), S- (Synthese der DNA), G_2 - und M- (Mitose) Phase. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, die während der M-Phase zu gleichen Teilen in die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Die Übergänge zwischen den jeweiligen Zellzyklusphasen sind streng kontrolliert. Besonders wichtige Kontrollpunkte befinden sich am Ende der G_1 -Phase vor der Verdopplung der DNA (Restriktionspunkt) und am Übergang von der G_2 - in die M-Phase bevor das Erbgut aufgeteilt wird. Diese Kontrollpunkte sollen vor allem sicherstellen, daß die DNA vor der Zellteilung intakt ist. Die basalen molekularen Mechanismen sind allerdings nur teilweise bekannt.

Zu Beginn des Zellzyklus (G_1 -Phase) reagieren die Zellen auf eine Vielzahl von Stimuli, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Erst beim Erreichen des Restriktionspunktes am Ende der G_1 -Phase nimmt dieser Einfluß ab und es wird überprüft, ob die Zelle bereit ist, in die nächste Phase einzutreten. Ein Übergang in die S-Phase ist erst möglich, wenn die Zelle ausreichend für die DNA-Synthese vorbereitet ist (Zellgröße, Proteinstatus, intakte DNA, essentielle Aminosäuren und Nukleotide; Pardee, 1989). Ungünstige Wachstumsbedingungen wie Nährstoffmangel oder DNA-Schäden können dafür sorgen, daß die Zellen reversibel am Restriktionspunkt in der G_1 -Phase (oft auch als G_0 -Phase bezeichnet) angehalten werden oder bei zu großen Schäden in den programmierten Zelltod (Apoptose) gehen (als Übersicht Sherr, 1994; Sherr, 1995).

2.2.1. Die aktivierenden Regulatoren des Zellzyklus

Schlüsselregulatoren der G_1 -Phase, der längsten Phase des Zellzyklus, sind die D-Zykline (Zyclin D1, -D2, -D3), die mit den Zyclin-abhängigen Kinasen CDK4 oder CDK6 einen aktiven Komplex bilden, und das mit CDK2 interagierende Zyclin E (Übersicht in Sherr, 1994; Sherr, 1995).

Die D-Zykline werden nach Mitogenstimulation transkriptionell induziert und haben ihre stärkste Expression vor dem Übergang von der G_1 - in die S-Phase. Werden den Zellen allerdings Wachstumsfaktoren entzogen, so findet eine Arretierung der Zellen in der G_1 -Phase und ihr Abbau statt. Die Zyclin-abhängigen Kinasen werden konstant während des Zellzyklus exprimiert, jedoch ist für ihre Funktion eine Bindung an die jeweiligen Zykline notwendig. Die Aktivität der Zyclin D-abhängigen Kinase-Komplexe tritt in der Mitte der G_1 -Phase auf und ist bis zum Übergang in die S-Phase nachzuweisen (Matsushime et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994). Mikroinjektionsstudien mit Antikörpern gegen Zyclin D1 in Fibroblasten belegen die Bedeutung von Zyclin D-abhängigen Kinase-Komplexen in diesem Zellzyklus-Abschnitt (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993).

Im Gegensatz zu den D-Zyklinen wird Zyclin E periodisch im Zellzyklus exprimiert (mit einem Maximum gegen Ende der G_1 -Phase). Es bildet zusammen mit CDK2 einen Komplex, der beim Übergang von der G_1 - in die S-Phase aktiv ist (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992; Ohtsubo et al., 1995). Sobald sich die Zellen in der S-Phase befinden, wird Zyclin E durch Ubiquitinierung abgebaut und CDK2 freigesetzt. Eine Hemmung von CDK2 führt zu einer Blockierung der Zellen in G_1 (Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993; van den Heuvel und Harlow, 1993), während eine Überexpression von Zyclin E und/oder Zyclin D zu einer Verkürzung der G_1 -Phase sowie zu einer reduzierten Zellgröße und einer verringerten Abhängigkeit der Zellen gegenüber Mitogenen führt (Ohtsubo und Roberts, 1993; Quelle, et al., 1993).

Eine wesentliche Aufgabe der G_1 -Phase-Zykline ist die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) und pRb-verwandter Proteine, wie p107 oder p130 (Weinberg, 1995; Johnson et al., 1998). Hypophosphoryliertes pRb bildet zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und den Dimerisierungs-Proteinen (DP) einen Komplex. Durch diese Komplexbildung wird die Transaktivierungsfunktion von E2F reprimiert und die Expression der E2F-Zielgene *zyclin E*, *zyclin A*, *cdc2*, *DNA-polymerase α* , *dihydrofolatreduktase (dhfr)*, *c-myb*, *c-myc* sowie *E2F* selbst wird verhindert (als Übersicht Bartek et al., 1997). Erst die Phosphorylierung von pRb am Ende der G_1 -Phase durch Zyclin D-CDK4/CDK6 oder Zyclin E-CDK2 führt zu der Freisetzung von E2F, zur transkriptionellen Aktivierung der Zielgene und zum Fortschreiten im Zellzyklus (als Übersicht Nevins et al., 1991; Weinberg, 1995).

Die D-Zykline können im Gegensatz zu Zyclin E oder A direkt an pRb binden (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993), wodurch CDK4 in die Nähe seines Substrates gebracht wird. Zyclin D-CDK4 und Zyclin D-CDK6 phosphorylieren bevorzugt pRb, während Zyclin E- und Zyclin A-CDK2 in *in vitro* Experimenten bevorzugt Histon H1 als Substrat benutzen (Matsushime et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994).

Die Durchwanderung des Zellzyklus von der S- in die G_2 -Phase und weiter in die Mitose wird hauptsächlich durch die Aktivität der Zyclin A-CDK2- und Zyclin B-CDC2-Kinase-Komplexe reguliert (Desdouets et al., 1995b; Furuno et al., 1999). Dabei ist Zyclin A-CDK2 ein

entscheidender Faktor bei der DNA-Synthese und für den Eintritt der Zellen in die Mitose, während Zyklin B-CDC2 für den Ablauf der Mitose, besonders die Auflösung der Kernmembran und den Aufbau der Mitosespindel, wichtig ist (Furuno et al., 1999). Die Mikroinjektion von Antikörpern gegen Zyklin A oder „antisense“-RNA verhindert die DNA-Replikation in Säugetier-Zellen, während die Blockierung der Zyklin A-CDK2-Aktivität in der Mitose gezeigt hat, daß der Komplex für die Aktivierung und die Translokation von Zyklin B-CDC2 benötigt wird (Girard et al., 1991; Zindy et al., 1992; Furuno et al., 1999).

2.2.2. Die Inhibitoren des Zellzyklus

Die Aktivität der Zykline und ihrer assoziierten Kinasen wird zusätzlich über die sogenannten CDK-Inhibitoren (CKI) kontrolliert. Die CKIs werden aufgrund ihrer Struktur und ihres Bindungspartners in zwei Familien eingeteilt. Die erste Familie beinhaltet die INK4 Proteine („inhibitors of CDK4“), die spezifisch CDK4 und CDK6 inhibieren. Zu ihnen gehören p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} (Serrano, 1997; Hannon und Beach, 1994; Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995; Chan et al., 1995). Sie besitzen mehrere Ankyrin-Domänen und inhibieren spezifisch die Zyklin D-abhängige Kinase-Aktivität, was zur Hemmung der pRb-Phosphorylierung führt und die Zellen in der G₁-Phase arretiert. Neben der INK4-Protein-Familie gibt es die unspezifischeren CKIs der Cip/Kip-Familie. Sie beeinflussen die Aktivität von Zyklin D-, Zyklin E- und Zyklin A-abhängigen Kinase-Komplexen. Zu der Familie gehören p21^{WAF, Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993; Dulic et al., 1994; Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter 1994; Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995; Deng et al., 1995). Sie besitzen an ihrem aminoterminalen Ende eine Domäne, die es ihnen ermöglicht, Zykline und auch CDKs zu binden (Chen et al., 1995, Chen et al., 1996). Die Mitglieder der Cip/Kip Familie sind sowohl negative als auch positive Regulatoren. Sie inhibieren Zyklin E- und Zyklin A-Kinase-Komplexe, während sie Zyklin D-Kinase-Komplexe aktivieren können (Sherr und Roberts 1999). Die Transkription des *p21^{Cip1}* Gens wird von dem Protein des Tumorsuppressorgens *p53* induziert (Levine, 1997). *p53* hat im Zellzyklus die Funktion, die intakte Weitergabe der DNA zu gewährleisten. So führt die Einwirkung von DNA-schädigenden Einflüssen zur erhöhten Expression von *p53*, nachfolgend zur Aktivierung von *p21^{Cip1}* und damit zur Arretierung der Zellen am Ende der G₁-Phase.

Ein Eingreifen in den Zellzyklusablauf und damit eine Veränderung der Proliferation kann auf mehreren Ebenen stattfinden. So kann z.B. eine veränderte Expression von Zyklinen, CDKs und/oder CKIs zu einem unkontrollierten Wachstum von Zellen und als Folge zur Tumorentstehung führen (Lukas et al., 1995).

2.3. Fragestellung

Die Tatsache, daß eine geringe Veränderung der Zellzykluskontrolle zu einer veränderten Proliferation und zur Tumorentstehung beitragen kann, macht es notwendig, die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen im Detail zu untersuchen.

Bisherige Studien haben gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor AP-1 entscheidend an dieser Regulation beteiligt ist. Da die einzelnen AP-1-Mitglieder aber spezifische, nicht redundante Funktionen ausüben, ist es wichtig, die Rolle der einzelnen AP-1-Proteine genau zu beschreiben. Die Messung der Gesamtaktivität von AP-1 oder die Untersuchung von bisher bekannten

AP-1-regulierten Genen bietet jedoch keine Möglichkeit, den Beitrag der individuellen Proteine zur Regulation der Proliferation und des Zellzyklus zu bestimmen. Auch die Verwendung von transdominant-negativ wirkenden Mutanten erlaubt keine schlüssige Aussage über die Bedeutung eines einzelnen AP-1-Proteins. Das am besten geeignete System zur Untersuchung der spezifischen Funktionen der einzelnen AP-1-Mitglieder im Säugetierorganismus ist das gezielte Ausschalten des jeweiligen Gens in embryonalen Stammzellen der Maus und die nachfolgende Generierung von Embryonen bzw. Mäusen, denen dieses bestimmte AP-1-Mitglied fehlt. Aus solchen defizienten Embryonen können dann primäre Zellen isoliert und nachfolgend immortale Zelllinien, vorwiegend Fibroblasten, etabliert werden.

Bisher ist nur sehr wenig über die Funktion der AP-1-Untereinheit JunB bei der Regulation der Proliferation und des Zellzyklus bekannt. Da JunB hemmend auf das in den Zellzyklus eingreifende Protein c-Jun wirken kann, könnte JunB selbst auch einen bedeutenden Einfluß auf die Proliferation bzw. den Zellzyklus haben. Außerdem wird JunB zusätzlich zu den gleichen Signaltransduktionskaskaden, die den c-Jun-Promotor steuern, durch die Adenylat-Zyklase- und die Smad-Protein-Kaskade reguliert (Jonk et al., 1998). Man kann daher annehmen, daß JunB auch individuelle und spezifische Funktionen in biologischen Prozessen wie der Proliferation hat. Diese Annahme wird noch gestärkt durch die Fähigkeit von JunB, neben seiner oft beschriebenen hemmenden Funktion selbst auch als starker transkriptioneller Aktivator zu wirken (Chiu et al., 1989). Besonders deutlich wird die einzigartige Rolle von JunB innerhalb der AP-1-Familie dadurch, daß die JunB-defizienten Embryonen den frühesten Phänotyp aller AP-1-Untereinheiten zeigen und sich deutlich in ihrem Phänotyp von dem der c-Jun-defizienten Embryonen unterscheiden, obwohl c-Jun das am nächsten verwandte Protein darstellt. Insgesamt betrachtet ist es also durchaus denkbar, daß JunB eine weitere spezifische Verbindung zwischen den Mitogen-aktivierten Signaltransduktionskaskaden und der Zellzyklusregulation darstellt.

Die Analyse der Proliferation in den JunB-defizienten Embryonen ergab keine deutlichen Unterschiede zu den Wildtyp-Embryonen. Allerdings erlaubte der plazentale Defekt der Embryonen nur eine sehr grobe Analyse, die Zellzyklusregulation im Detail zu untersuchen war nicht möglich. Daher sollte in dieser Arbeit die Proliferation und die Zellzyklusregulation in JunB-defizienten Fibroblasten untersucht werden, die aus den defizienten Embryonen abgeleitet wurden. Diese Zellen haben den Vorteil, daß es mit ihnen möglich ist, zellautonome Funktionen zu untersuchen, die nicht auf der Interaktion von verschiedenen Zelltypen basieren, wie es im Gesamtorganismus der Fall sein kann. Mit diesem Ansatz sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Spielt JunB eine Rolle bei der Proliferation und der Zellzyklusregulation ?
- Welche Funktion hat JunB im Zellzyklusablauf ?
- Was sind die kritischen Angriffspunkte (JunB Zielgene) ?