

Ermittlung und Charakterisierung neuer DNA-
Bindungselemente des Glucocorticoidrezeptors in
Glucocorticoid-reprimierten Zielgenen

Vom Fachbereich Chemie der
Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin
Anja Dostert

Betreuer der Arbeit:

Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:

15. September 2004

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. September 2004

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter: PD Dr. T. Heinzel

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt von Juni 2000 bis August 2004 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thorsten Heinzel durchgeführt.

Die Betreuung an der Technischen Universität Kaiserslautern erfolgte durch Prof. Dr. Dieter Schrenk, Fachbereich Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie.

Meinem Vater
Peter Dostert
(1951 - 1981)

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Isaac Newton (1643-1727)

Zusammenfassung

Der Glucocorticoid-Rezeptor (GR), der zu den Steroidhormon-Rezeptoren zählt, reguliert physiologische Prozesse durch Aktivierung und Repression spezifischer Zielgene. Der ligandengebundene Rezeptor aktiviert die Genexpression, indem er als Dimer an spezifische DNA-Sequenzen (glucocorticoid response element, GRE) bindet. Der GR reprimiert seine Zielgene entweder durch Bindung an negative GREs (nGREs, Cis-Repression) oder durch DNA-unabhängige Bindung an andere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF- κ B (Trans-Repression). Glucocorticoide sind sehr effektive Medikamente für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen. Langzeittherapie mit Glucocorticoiden ist jedoch problematisch wegen der auftretenden Nebenwirkungen. Bisher ging man davon aus, dass die antiinflammatorischen Wirkungen der Glucocorticoide weitgehend über den Mechanismus der Trans-Repression reguliert werden, wohingegen die Nebenwirkungen vor allem durch DNA-bindungsabhängige Aktivierung (GRE) und Repression (nGRE) von Zielgenen vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-bindungsabhängige Cis-Repression untersucht. Dabei wurden sowohl neue nGRE-Bindungs-elemente identifiziert, als auch bereits bekannte Elemente hinsichtlich der involvierten Kofaktoren näher charakterisiert.

Es wurde mit Hilfe des ABCD-Bindungstests die Affinität des GR zum DNA-Element in Abhängigkeit vom Ligandenbindungsstatus (Agonist, Antagonist, ohne Ligand) des Rezeptors untersucht. Der Rezeptor bindet das Konsensus-DNA-Element *in vitro* weitgehend unabhängig von dem eingesetzten Liganden. Der ABCD-Bindungstest wurde außerdem eingesetzt, um GR-Kofaktoren mittels Western Blot und Massenspektrometrie zu identifizieren. Der Korepressor N-CoR (nuclear receptor corepressor) bindet den GR-DNA-Komplex *in vitro* in Abhängigkeit vom Ligandenbindungsstatus. Massenspektrometrisch konnten mit dieser Methode Proteine wie Hsp90, Hsp70 und β -Tubulin identifiziert werden. Diese Proteine stehen im Kontext mit GR im Nukleus, jedoch konnten mit der eingesetzten Methode keine der (in wesentlich geringerer Konzentration vorhandenen) ‚klassischen‘ Koaktivatoren oder Korepressoren ermittelt werden.

Die Konsensussequenz von nGREs weist erhebliche Unterschiede zu der klassischen GRE-Sequenz auf. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der GR zu nGREs eine deutlich niedrigere Bindungsaffinität hat als zu GREs. Derzeit geht man davon aus, dass die DNA die Konformation des Rezeptors durch allosterische Effekte moduliert. Mit Hilfe des partiellen Proteaseverdau ein Hinweis dafür erbracht werden, dass der Glucocorticoid-Rezeptor auf einem positiven GRE in einer anderen Konformation vorliegt als auf einem negativen GRE, was in einem unterschiedlichen Bandenmuster resultiert.

Die mRNA-Expressionsanalyse (Affimetrix) von T-Zellen aus GR^{wt}- bzw. GR^{dim/dim}-Mäusen ergab eine bisher unerwartete Rolle der DNA-abhängigen GR-Genregulation in der inflammatorischen Immunantwort (G. Schütz und P. Krammer, DKFZ). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene FasLigand (CD95L) und SOCS-3 bezüglich vorhandener nGREs sowohl *in silico* als auch *in vitro* analysiert. Die GR-vermittelte Repression des FasL spielt bei dem aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) eine Rolle. SOCS-3 blockiert die Wirkung von Zytokinen durch Inhibierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges und ist in die Regulation der HPA-(hypothalamic-pituitary-adrenal) Achse eingebunden. Um die Hinweise der mRNA-Expressionsanalyse zu bestätigen, wurden Luciferase-Reportergentests mit FasL- bzw. SOCS-3-Promotorkonstrukten bei Kotransfektion von GR^{wt} oder GR^{dim} durchgeführt. Durch Einfügen einer Punktmutation (A458T) in der DNA-Bindungsdomäne (GR^{dim}) verliert der GR seine Fähigkeit zur Dimerisierung und damit seine Fähigkeit zur DNA-Bindung (Heck *et al.* 1994; Reichardt *et al.*, 1998). Der Mechanismus der Trans-Repression wird von dieser Mutation nicht beeinflusst. Somit hat man die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Cis- und Trans-Mechanismen. Im Vergleich mit bereits charakterisierten Promotoren konnte sowohl für FasL als auch für SOCS-3 der Mechanismus der Cis-Repression nachgewiesen werden.

Negative GREs zeigen im Gegensatz zu positiven GREs keine gute Konservierung der DNA-Sequenz. Um potenzielle nGREs in den neuen Zielgenen *in silico* zu charakterisieren, wurde durch Analyse bereits charakterisierter nGREs ein Suchmuster entwickelt. Dieses Suchmuster ist aufgrund der schlechten Konservierung der nGREs sehr offen. Deshalb wurden die ermittelten DNA-Bereiche im ABCD-Bindungstest auf ihre Affinität zum GR überprüft. Mutation der *in vitro* bestätigten GR-Bindungselemente führte zum Verlust der GR-Bindungsaffinität. Für den FasL-Promotor konnten drei potenzielle GR-Bindungselemente ermittelt werden. Zwei dieser Bindungsstellen binden den GR im Kontext der Zelle (Chromatin-Immunpräzipitation, N. Novac, AG Heinzl). Für den SOCS-3-Promotor wurden zwei GR-Bindungsstellen charakterisiert. Die weitere Charakterisierung dieser potenziellen nGREs erfolgt in Kürze.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Ermittlung neuer negativer Bindungselemente des GR ein Hinweis dafür erbracht werden, dass nGREs auch im Kontext der Immunsuppression eine Rolle spielen und dass der Korepressor N-CoR möglicherweise bei der Cis-Repression von Bedeutung ist.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT1A	Serotonin
aa	Aminosäuren
ABCD	Avidin Biotin Complex DNA
ABCDE	Avidin Biotin Complex DNA Elution
AF	Aktivierungsfunktion
AFP	α -Fetoprotein
amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfid
AR	Androgen-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	‚bovine serum albumine‘
cDNA	‚complementary‘ DNA
cGRE	‚composite‘ GRE, Komposit-GRE
CREB	‚cAMP response element‘ Bindungsfaktor
CRF, CRH	Corticotropin -freisetzendes Hormon
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dex	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreiol
E.coli	Escherichia coli
ECL	‚enhanced chemiluminescence‘
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Estrogenrezeptor
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gravität, Gramm
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
GC	Glucocorticoid
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoidrezeptor ‚response element‘
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HRE	Hormon ‚response element‘
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IP	Immun-Präzipitation

kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MMTV	'mouse mammary tumor virus'
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
N-CoR	'nuclear receptor corepressor'
NETN	NaCl, EDTA, Tris, NP-40
NF-κB	'nuclear factor-κB'
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nGRE	negatives GRE
NP-40	Nonidet P-40
OC	Osteocalcin
Oct-1	'octamer binding transcription factor 1'
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	'phosphate buffered saline'
Pbx	,pre-B-cell leukemia transcription factor 1'
PCR	'polymerase chain reaction'
Pit-1	,pituitary specific transcription factor 1'
POMC	Proopio-melanocortin
PLF	Proliferin
PMA	Phorbolmyristolacetat
PPAR	,peroxysome proliferator activated receptor'
PR	Progesteron-Rezeptor
RAR	Retinsäurerezeptor
RIP140	'receptor interacting protein 140'
RU486	Mifepriston
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMRT	,silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors'
STAT	'signal transduction-activated transcription factor'
TAT	Tyrosin Aminotransferase
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-13-Phorbolacetat
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
VDR	Vitamin D-Rezeptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln einiger Glucocorticoide	1
Abbildung 2: Die HPA-Achse (Reichardt <i>et al.</i> 1998).....	2
Abbildung 3: Struktur von Steroidhormonen im Vergleich (Lewin 2000)	4
Abbildung 4: Struktur verschiedener DNA-Bindungselemente (Aranda und Pascual 2001) ...	5
Abbildung 5: Struktur der Nukleären Rezeptoren (Novac und Heinzel 2004)	7
Abbildung 6: Posttranslationale Modifikationen an Histon-N-Termini.....	12
Abbildung 7: Veränderung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikation.....	13
Abbildung 8: Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors (Dostert und Heinzel 2002)	15
Abbildung 9: Domänenstruktur des Glucocorticoid-Rezeptors.....	16
Abbildung 10: Die verschiedenen Aminosäure-Mutationen in der D-Schleife der DBD.....	17
Abbildung 11: Die HPA-Achse (Reichardt <i>et al.</i> 1998).....	18
Abbildung 12: MMTV-Tandem Arrays (McNally <i>et al.</i> 2000).....	21
Abbildung 13: Sequenzvergleich verschiedener negativer GR-Bindungselemente.....	23
Abbildung 14: Die Rolle des FasLiganden beim Aktivierungs-induzierten Zelltod	30
Abbildung 15: Regulation von SOCS-3 und POMC (Auernhammer und Melmed 2001)	32
Abbildung 16: Strukturvergleich des humanen und murinen AFP-Promotors.....	35
Abbildung 17: Vektorkarte des pGL3-Basic Vektors (Promega).....	43
Abbildung 18 PCR mit biotinylierten Primern	53
Abbildung 19: Strukturformel von Biotin (Vitamin H)	56
Abbildung 20: Der ABDC-Bindungstest.....	57
Abbildung 21 Schematische Darstellung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie	63
Abbildung 22: Der ABCD-Bindungstest mit verschiedenen Bindungselementen.....	67
Abbildung 23: Der ABCD-Bindungstest mit POMC -Bindungselementen	67
Abbildung 24: Der ABCD-Bindungstest mit verschiedenen DNA-Fragmenten	68
Abbildung 25: Analyse des POMC-Promotors mit bereits bekanntem nGRE	69
Abbildung 26: Die DNA-Sequenz des proximalen POMC-Promotors	69
Abbildung 27: Überprüfung der ligandenabhängigen Bindungsaffinität des GR	70
Abbildung 28: Co-Immunpräzipitation von GR und dem Koaktivator SRC-1 (NCoA2)	72
Abbildung 29: Co-Immunpräzipitation von GR und dem Korepressor N-CoR.....	72
Abbildung 30: ABDC-Bindungstest mit GR und dem Korepressor N-CoR.....	73
Abbildung 31 ABDC-Bindungstest von GR und HMG-1	74
Abbildung 32: Vergleich positiver und negativer GREs im partiellen Proteaseverdau.....	76
Abbildung 33: ABCD-Bindungstest zur Aufreinigung von rekombinantem GR	77
Abbildung 34: Die ABCDE-Proteinaufreinigung: Elution von GR-assoziierten Proteinen	78
Abbildung 35: ABCDE-Proteinaufreinigung, Sequenzierung eines 250kDa-Proteins	78
Abbildung 36: Gelfärbung mit kolloidalem Coomassie Blue	79

Abbildung 37: ABCDE-Proteinaufreinigung, massenspektrometrische Analyse.....	80
Abbildung 38: Entwicklung eines Suchmusters für potenzielle nGREs	81
Abbildung 39: Luciferase-Reportergentest mit dem Collagenase-Promotor	82
Abbildung 40: Luciferase-Reportergentest mit dem POMC -Promotor.....	83
Abbildung 41: Luciferase-Reportergentest mit dem MMTV-Promotor.....	84
Abbildung 42: Luciferase-Reportergentest mit dem MMTV-Promotor (gestripptes FCS).....	85
Abbildung 43: Luciferase-Reportergentest mit dem humanen FasL-Promotor.....	87
Abbildung 44: Der Luciferase-Reportergentest: Mittelwerte und Fehlerbalken	87
Abbildung 45: Potenzielle nGREs im FasL-Promotor	88
Abbildung 46: Der murine FasL-Promotor: ABCD-Bindungstest.....	89
Abbildung 47: DNA-Sequenzen potenzieller nGREs und deren Mutation.....	90
Abbildung 48: ABCD-Bindungstest: Spezifische Mutation der potenziellen nGREs	90
Abbildung 49: Luciferase-Reportergentest mit dem murinen SOCS-3-Promotor.....	91
Abbildung 50: Luciferase-Reportergentest mit SOCS-3-Promotor-Konstrukten	92
Abbildung 51: Verschiedene Promotorkonstrukte des murinen SOCS-3-Promotors.....	93
Abbildung 52: Potenzielle nGREs im SOCS-3-Promotor.....	93
Abbildung 53: Der murine SOCS-3-Promotor: ABCD-Bindungstest.....	94
Abbildung 54: Die DNA-Sequenzen potenzieller nGREs und deren Mutation	95
Abbildung 55: Der FasL-Promotor und RU486	96
Abbildung 56: Der POMC -Promotor und RU486.....	97
Abbildung 57: Der POMC -Promotor in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren.....	98
Abbildung 58: Der FasL-Promotor in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren	98
Abbildung 59: Mechanismen der Genmodulation durch den Glucocorticoid-Rezeptor.....	100
Abbildung 60: Strukturformel und dreidimensionale Ausrichtung von RU486.....	107
Abbildung 61: Modell der verschiedenen Bindungsmechanismen des GR.....	109
Abbildung 62: Bindungselemente des humanen FasL (CD95L)-Promotors.....	119
Abbildung 63: Schematische Darstellung des murinen SOCS-3-Promotors.....	120
Abbildung 64: Modell der Regulation corticotropher Zellen	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht nGREs (Dostert und Heinzel 2004).....	22
Tabelle 2: Chemikalien und Bezugsquellen	37
Tabelle 3: Lösungen und Puffer.....	39
Tabelle 4: Eukaryontische Expressionsplasmide.....	42
Tabelle 5: Eukaryontische Reporterplasmide.....	42
Tabelle 6: GR-Antikörper	44
Tabelle 7: Sonstige Antikörper.....	44
Tabelle 8: Enzyme und Enzymkits.....	45
Tabelle 9: Primer für die PCR.....	45
Tabelle 10: Biotinylierte DNA-Oligos	46
Tabelle 11: Eingesetzte Bakterienstämme.....	47
Tabelle 12: Eingesetzte Zelllinien	47
Tabelle 13: Substanzen zur Zellbehandlung: Stammlösungen und Konzentrationen.....	64
Tabelle 14: Nomenklatur der verschiedenen Mechanismen des GR	99
Tabelle 15: Koaktivatoren des Glucocorticoid-Rezeptors.....	111
Tabelle 16: Korepressoren des Glucocorticoid-Rezeptors.....	113
Tabelle 17: Massenspektrometrisch ermittelte GR-Kofaktoren	114

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Biologische Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors	1
1.2. Nukleäre Hormon-Rezeptoren	4
1.2.1. Allgemeines	4
1.2.2. Transkriptionelle Repression	9
1.2.3. Post-translatorische Modifikationen	10
1.2.4. Regulation der Transkription durch Chromatin-Modifikationen	11
1.3. Molekulare Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors	14
1.3.1. Allgemeines	14
1.3.2. Mausmodelle zur Analyse des GR-Mechanismus	16
1.4. Transrepression	18
1.5. Positive Glucocorticoid-Rezeptor Bindungselements (GREs)	20
1.6. Negative Glucocorticoid-Rezeptor Bindungselemente (nGREs)	21
1.7. Negative GREs in der neuronalen und hormonellen Regulation	23
1.7.1. Der POMC-Promotor	23
1.7.2. Der Prolactin- Promotor	24
1.7.3. Der Proliferin-Promotor	25
1.7.4. Der CRH-Promotor	25
1.7.5. Der Promotor des neuronalen Serotonin-Rezeptors	26
1.7.6. Der Promotor des VIP Typ I Rezeptors	26
1.7.7. Der Gonadotropin-Promotor	26
1.7.8. Der GnRH Promotor	27
1.8. Negative GREs und Immunmodulation	27
1.8.1. Apoptose	27
1.8.2. Der FasL (CD95L)-Promotor und der Aktivierungs-induzierte Zelltod	28
1.8.3. Der SOCS-3-Promotor	30
1.8.4. Der Interleukin-1 β -Promotor	33
1.9. Weitere negative GREs	33
1.9.1. Der Osteocalcin-Promotor	33
1.9.2. Die Keratin-Promotoren	34
1.9.3. Der α -Fetoprotein-Promotor	34
2. Aufgabenstellung	36

3. Material und Methoden	37
3.1. Material	37
3.1.1. Chemikalien	37
3.1.2. Lösungen und Puffer	39
3.1.3. Plasmide	42
3.1.4. Antikörper	44
3.1.5. Enzyme	45
3.1.6. Primer und Oligonukleotide	45
3.1.7. Bakterien	47
3.1.8. Zelllinien	47
3.2. Methoden	48
3.2.1. Klonierung	48
3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	51
3.2.3. PCR mit biotinylierten Primern	52
3.2.4. Herstellung von Proteinlysaten	54
3.2.5. Immunopräzipitation (IP)	55
3.2.6. Der ABCD-Bindungstest	56
3.2.7. Die ABCDE-Proteinaufreinigung	58
3.2.8. Der partielle Proteaseverdau	58
3.2.9. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach Lämmli	59
3.2.10. Westernblot und Immunfärbung	60
3.2.11. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	61
3.2.12. MALDI-TOF Massenspektrometrie	62
3.2.13. Methoden der Zellkultur	64
4. Ergebnisse	66
4.1. Der ABCD-Bindungstest zur Analyse von GR-Bindungselementen	66
4.2. Biotinylierte PCR-Produkte im ABCD-Bindungstest	68
4.3. Ligandeneffekt	70
4.3.1. Ligandenabhängige Bindungsaffinität des GR zur DNA	70
4.3.2. Ligandenabhängige Bindungsaffinität von Kofaktoren zu GR	71
4.4. Konformation des Glucocorticoid-Rezeptors	75
4.5. Affinitätsreinigung von Kofaktoren des GR	76
4.6. Sequenzanalyse der nGREs	80
4.7. Der Luciferase-Reportergentest zur Unterscheidung von Cis- und Trans-Repression	81
4.7.1. Der Collagenase 1-Promotor	82
4.7.2. Der POMC-Promotor	83
4.7.3. Der MMTV-Promotor	84
4.8. Der FasL (CD95L)-Promotor	86

4.8.1.	Luciferase-Reportergentest	86
4.8.2.	Ermittlung der Bindungsspezifität des GR	88
4.9.	Der SOCS-3-Promotor	91
4.9.1.	Luciferase-Reportergentest	91
4.9.2.	Ermittlung der Bindungsspezifität des GR	93
4.10.	Der GR-Antagonist RU486 auf nGREs	96
4.11.	Histondeacetylase-Inhibitoren	97
5.	Diskussion	99
5.1.	Die Relevanz der nGREs für die Wirkung von Glucocorticoiden	99
5.2.	Strategien zur Unterscheidung der verschiedenen GR-Repressionsmechanismen	102
5.3.	Ligandenabhängige DNA-Bindung des GR	103
5.4.	Die Konformationen des Glucocorticoid-Rezeptors	106
5.5.	Kofaktoren des Glucocorticoid-Rezeptors	109
5.6.	Mögliche Mechanismen der GR-Genregulation	117
5.7.	Neue nGRE-regulierte Zielgene	117
5.7.1.	FasLigand	118
5.7.2.	SOCS-3	119
5.7.3.	Die Bedeutung der neu charakterisierten Cis-reprimierten Zielgene	121
6.	Ausblick	123
7.	Literatur	124
8.	Veröffentlichungen	141

1. Einleitung

1.1. Biologische Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors

Synthetische Glucocorticoide (GC) wie z.B. Prednisolon und Dexamethason (Abbildung 1) werden häufig zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Magiakou und Chrousos 2002). Endogene GCs (Cortisol beim Menschen, Corticosteron bei der Maus) werden aus dem Vorläufer Cholesterol gebildet und von der Nebennierenrinde in einem zirkadianen Rhythmus oder als Stressreaktion in die Blutzirkulation abgegeben. Die freigesetzten Glucocorticoide binden zum größten Teil (ca. 80%) an Proteine wie Albumin und Cortisol-bindendes Protein (CBG, Transkortin). 10% der GCs binden auch an die Erythrozytenmembran und 10 % liegen in freier und damit in biologisch aktiver Form vor.

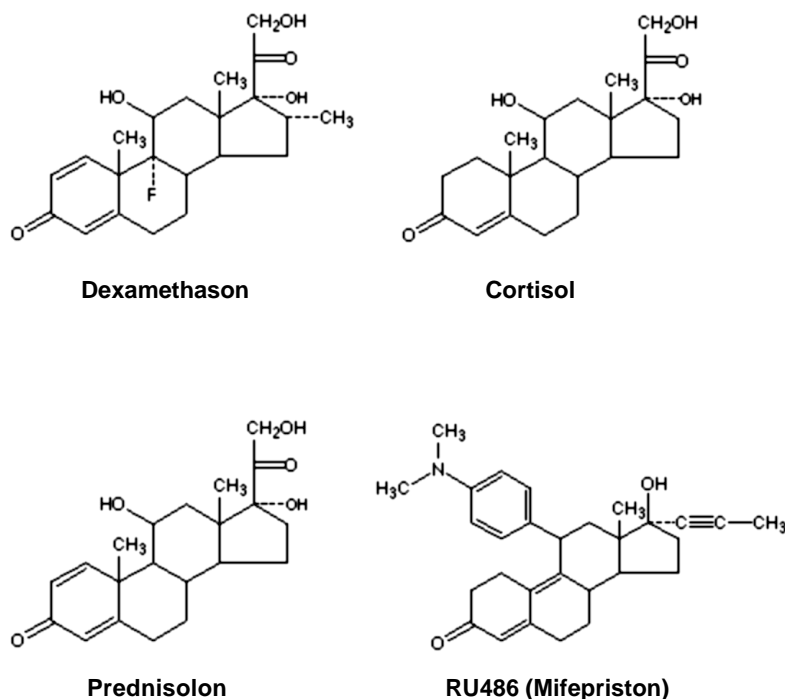


Abbildung 1: Strukturformeln einiger Glucocorticoide

Die Abbildung zeigt die Strukturformeln von Cortisol, den synthetischen Glucocorticoiden Dexamethason und Prednisolon, und dem GR-Antagonisten RU486 (Mifepriston). Prednisolon und Dexamethason sind die am häufigsten verwendeten synthetischen Cortisol-Analoga in der GC-Therapie. Sie aktivieren im Gegensatz zu Cortisol nur den GR, nicht jedoch den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR). Der GR-Antagonist RU486 ist ebenfalls ein Antagonist des Progesteron-Rezeptors (PR) und wird aufgrund dieser Eigenschaft auch als Abortivum eingesetzt.

Die GC-Synthese in der Nebennierenrinde wird durch die Aktivität der HPA-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, Abbildung 2) kontrolliert. Die HPA-Achse ist ein organübergreifendes homöostatisches System, das die Gluconeogenese, angeborene und adaptive Im-

munität und Entzündungsreaktionen kontrolliert. Sie stellt eine fein regulierte Verbindung zwischen dem neuroendokrinen System und dem Immunsystem dar, sowohl im Bezug auf Stress als auch im Hinblick auf zirkadische Regulation (Webster *et al.* 2002). Sie ist die wichtigste hormonelle Regulationsmöglichkeit, mit der das zentrale Nervensystem (ZNS) auf das Immunsystem Einfluss nimmt. Der paraventriculäre Nucleus (PVN) im Hypothalamus steht unter Kontrolle des Hippocampus und der Amygdala und reagiert auf Stresseinflüsse, indem er Corticotropin-freisetzendes Hormon (corticotropin releasing hormone, CRH) und Vasopressin in die Adenohypophyse ausschüttet. Diese Hirnanhangdrüse reagiert auf die beiden Neuropeptide mit der Synthese und Ausschüttung von Adrenocortikotropin (ACTH). Mit dem Blutstrom erreicht ACTH die *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde und stimuliert die Synthese und Ausschüttung von Glucocorticoiden. Dieses System steht über eine negative Rückkopplung im Gleichgewicht, wobei Glucocorticoide direkt die Synthese und Sekretion von ACTH in der Adenohypophyse und CRF im Hypothalamus inhibieren.

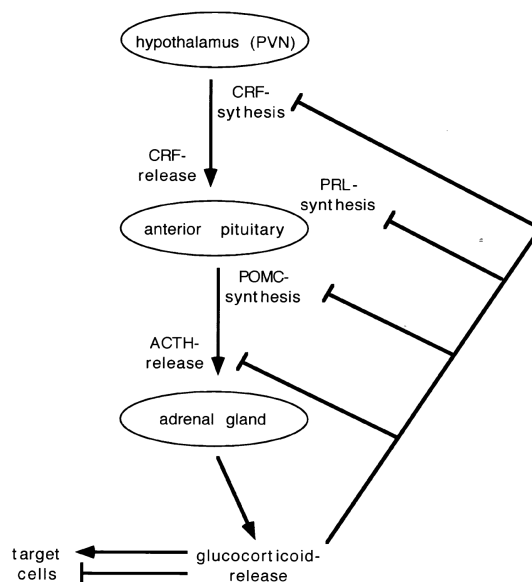


Abbildung 2: Die HPA-Achse (Reichardt *et al.* 1998)

Der paraventriculäre Nucleus (PVN) im Hypothalamus synthetisiert und sekretiert Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRF, CRH), welches die Adenohypophyse veranlasst POMC zu synthetisieren das POMC-Genprodukt ACTH (Adenocorticotrophes Hormon) in den Blutstrom auszuschütten. Die Nebennierenrinde reagiert auf das ACTH indem sie Glucocorticoide in die Blutbahn ausschüttet. Die HPA-Achse unterliegt einer Rückkopplung, indem die sekretierten Glucocorticoide die Synthese und Sekretierung von CRH und POMC reprimieren.

Der Cortisol-Spiegel hat normalerweise ein Minimum um Mitternacht, und ein Maximum um 9 Uhr morgens. Das wichtigste und wirksamste der Glucocorticoide ist neben geringen Mengen an Cortison (inaktive Form von Cortisol) und Corticosteron das Cortisol (Hydrocortison), welches auch mineralocorticoide Wirkung hat. Für die Inaktivierung von Cortisol zu Cortison ist das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) verantwortlich. Der Gehalt an

Steroidhormonen in der Nebennierenrinde ist gering, jedoch wird Cortisol beim Menschen täglich in einer Menge von 5-30 mg produziert, was zu einer Konzentration im Blut zwischen 5 und 20 µg/100ml führt (Plasmakonzentration von 70-550 nM). Die Inaktivierung der Hormone erfolgt im wesentlichen in der Leber, wobei Endprodukte, zusammen mit geringen Mengen an unverändertem Cortisol, mit dem Harn ausgeschieden werden.

Die physiologische Wirkung der Glucocorticoide besteht vor allem in einer Stimulation der Gluconeogenese durch die Neusynthese verschiedener Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels, sowie einer Hemmung der Glucose-Oxidation in den Zellen und einer damit verbundenen Erhöhung des Blutzucker-Spiegels. Da die zur Gluconeogenese verwendeten Aminosäuren einem verstärkten Proteinabbau in den peripheren Organen (Muskelgewebe, Knochenmatrix) zur Folge haben, kommt den Glucocorticoiden eine ausgesprochen katabole Wirkung zu. Glucocorticoide erlauben dem Organismus, auf Umweltveränderungen mit einer Anpassung ihrer Genexpression zu reagieren, um den aktuellen physiologischen Bedürfnissen zu entsprechen. Physischer (Infektionen, Verletzungen) oder emotionaler Stress (z.B. Anblick des Feindes) führt zu einer schnellen Aktivierung der HPA-Achse, was in einer Ausschüttung von Glucocorticoiden resultiert, welche dann das Immun-, Nerven- und endokrine System koordinieren. Somit sind Glucocorticoide an der Regulation der Energieversorgung des Körpers beteiligt, steuern Stoffwechselphasen und den Schlaf-Wachrhythmus, modulieren Funktionen des zentralen Nervensystems, den Fettmetabolismus sowie die Stressbereitschaft.

Bei Patienten mit einer Nebenniereninsuffizienz werden Glucocorticoide als Ersatz für die fehlenden endogenen GCs eingesetzt. Die Hauptanwendung von GCs ergibt sich jedoch aus ihrer antiinflammatorischen Wirkung. Im Gegensatz zu synthetischen Steroiden hat das endogene GC (Hydrocortison, Cortisol beim Menschen) eine weitaus geringere Aktivität und aktiviert neben GR auch den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) (de Kloet 2003). Synthetische Steroide können zwischen der Aktivierung von GR und MR unterscheiden. Sie unterdrücken die Reifung, die Differenzierung und die Proliferation von Immunzellen in allen Bereichen der Immunität (Franchimont *et al.* 2003). Daher werden Glucocorticoide zur Therapie eine Vielzahl entzündlicher Krankheitsbilder eingesetzt, wie z.B. Erkrankungen des Hormonhaushalts, der Haut, der Niere, des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege, des Nervensystems, der Augen, des Blutes und bei Autoimmunerkrankungen. Außerdem können Glucocorticoide verwendet werden, um die Abstoßung von Organtransplantaten zu verhindern (Magiakou und Chrousos 2002). Prednisolon und Dexamethason sind die am häufigsten verwendeten synthetischen Analoga von Cortisol (Abbildung 1). Dexamethason enthält ein zusätzliches Fluoratom, welches die Wirksamkeit des Medikaments erhöht, indem die Affinität zu GR erhöht und zudem der Abbau der Substanz verlangsamt wird. Der pharmakologische Effekt von Corticosteroiden beruht auf Stimulation des GR durch supraphysiologische Konzentra-

tionen des Liganden. Glucocorticoide werden auch in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt, z.B. bei Leukämien und Lymphomen (Magiakou und Chrousos 2002). Des Weiteren stimulieren GCs die Lungenreifung des ungeborenen Fötus bei zu erwartender Frühgeburt (Magiakou und Chrousos 2002).

Der therapeutische Einsatz von Glucocorticoiden ist durch das Spektrum von Nebenwirkungen, welche in erster Linie langfristig bei täglicher Gabe auftreten, limitiert (Schäcke *et al.* 2002a). Dazu gehören Fettsucht (das typische Mondgesicht), Osteoporose der Rippen und Wirbelkörper, Hemmung des Längenwachstums bei Kindern, Erhöhung des intraokulären Drucks, Hyperglykämie und Myopathie (Magiakou und Chrousos 2002; Schäcke *et al.* 2002a).

1.2. Nukleäre Hormon-Rezeptoren

1.2.1. Allgemeines

Die Familie der Nukleären Hormon-Rezeptoren umfasst eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in Entwicklung und Homöostase eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund ihrer Eigenschaft, auch kondensierte Chromatinabschnitte binden zu können, sind die nukleären Rezeptoren wichtige Initiatoren der Gentranskription. Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren kann die Aktivität von Nukleären Rezeptoren durch die Bindung ihrer entsprechenden Liganden, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Zellmembranen sehr leicht passieren können, moduliert werden.

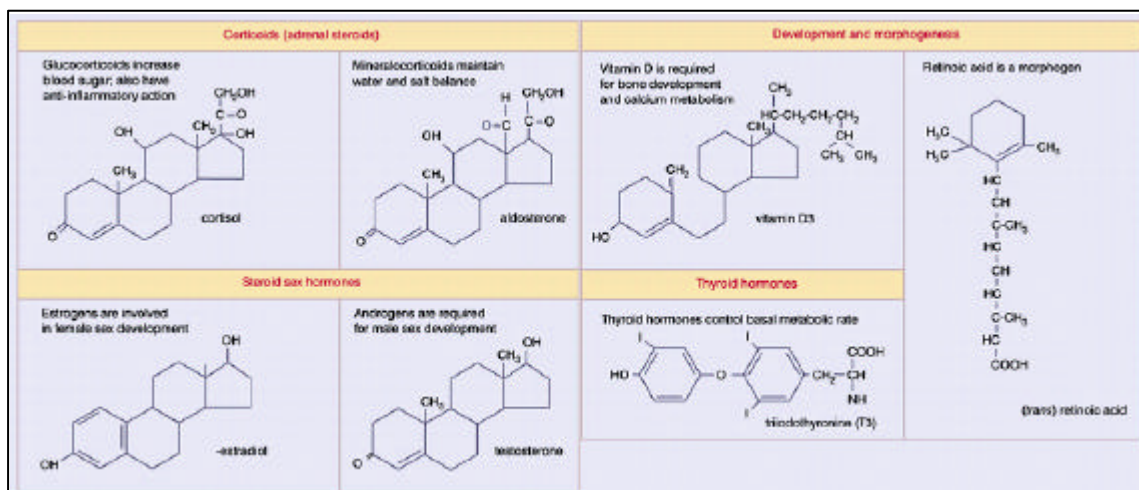


Abbildung 3: Struktur von Steroidhormonen im Vergleich (Lewin 2000)

Steroidhormone werden (mit Ausnahme von Retinsäure und den Thyroidhormonen) aus dem gemeinsamen Vorläufer Cholesterol synthetisiert. Als lipophile Substanzen sind sie dazu in der Lage, die Zellmembranen durch Diffusion zu passieren und im Zytoplasma bzw. im Zellkern ihren entsprechenden Steroid-Rezeptor zu binden.

Die Genregulation durch Hormon-Bindungselemente (HRE) ist in der Familie der Nukleären Rezeptoren weit verbreitet. Die Elemente befinden sich meist in der 5'-flankierenden Region ihrer Zielgene, entweder sehr dicht beim Kern-Promotor oder in sogenannten Enhancer-Bereichen einige Kilobasenpaare stromaufwärts der Transkriptionsinitiationstelle. Alle HREs bestehen aus zwei hexameren Motiven, die durch ein bis fünf Basenpaare voneinander getrennt sind. Sie können palindromisch, als invertierte Palindrome oder als sogenannte ‚Direct Repeats‘ (DR) strukturiert sein (Aranda und Pascual 2001). Die Steroidrezeptoren Glucocorticoid-Rezeptor (GR), Mineralocorticoid-Rezeptor (MR), Androgen-Rezeptor (AR) und Progesteron-Rezeptor (PR) binden ihre entsprechenden Bindungselemente bevorzugt als Homodimere. Die Bindungselemente haben die Konsensus-Sequenz 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' bzw. kommen dieser strukturell sehr nahe (Beato *et al.* 1989). Die Rezeptoren positionieren sich auf palindromischen DNA-Elementen ‚Kopf an Kopf‘ als Homodimere. Die Aminosäuren der D-Schleife und der Ligandenbindungsdomäne sind hierfür von Wichtigkeit. Nicht-Steroid-Rezeptoren der Klasse II wie TR (Thyroidhormon-Rezeptor), RAR (Retinsäure-Rezeptor), PPAR (‚Peroxisome Proliferator-Activated Receptor‘) und VDR (Vitamin D-Rezeptor) haben ihre höchste Bindungsaffinität für die DR-Elemente, die einen asymmetrischen Aufbau haben, und deren hexamere Motive durch eine unterschiedliche Anzahl von Basenpaaren voneinander getrennt sein können (Mangelsdorf *et al.* 1995). Rezeptoren dieser Klasse bilden bevorzugt Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) aus. Der Abstand zwischen den beiden Hexameren bestimmt hierbei die Rezeptorspezifität.

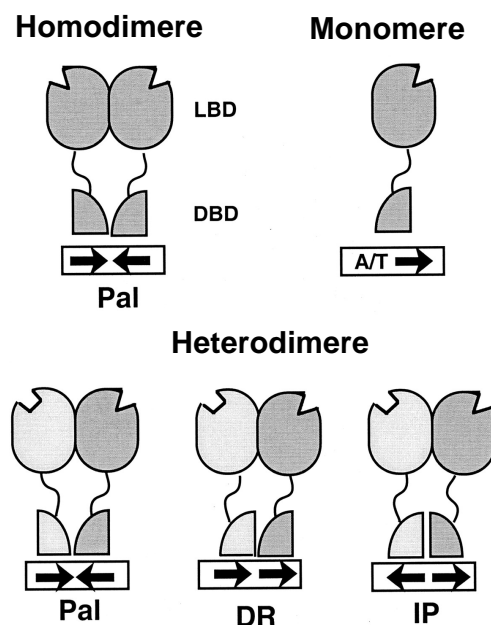


Abbildung 4: Struktur verschiedener DNA-Bindungselemente (Aranda und Pascual 2001)

Nukleäre Rezeptoren können als Monomere, als Homodimere oder auch als Heterodimere an ihre jeweiligen DNA-Bindungselemente (response elements, RE) binden. Dabei binden sie DNA-Sequenzen, die als palindromische Elemente (Pal), invertierte palindromische Elemente (IP) oder sogenannte ‚Direct Repeats‘ (DR) vorliegen.

Die Familie der Nukleären Hormon-Rezeptoren kann auch nach den DNA-Bindungseigenschaften und den Dimerisierungspräferenzen in vier Unterfamilien unterteilt werden. Die erste Subfamilie besteht aus Rezeptoren, die mit dem Rexinoid-Rezeptor RXR heterodimerisieren. Die Mitglieder dieser Familie können alle an DR-Elemente binden. Der TR α -Rezeptor bildet insoweit eine Ausnahme, als dass er ebenfalls symmetrische Bindungselemente erkennt. Die zweite Unterfamilie beinhaltet die Steroidhormon-Rezeptoren, welche in erster Linie als Liganden-induzierte Homodimere agieren. Zur dritten Gruppe gehören Rezeptoren, die DR-Bindungselemente als Homodimere binden. Die Rezeptoren der vierten Gruppe binden erweiterte ‚core sites‘ als Monomere. Diese Klassifizierung ist sehr grob und bezieht die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Familie nicht mit ein. Einige der in den letzten Jahren identifizierten Nukleären Hormon-Rezeptoren, die sogenannten ‚Orphan‘-Rezeptoren, haben keine uns bekannte Liganden (Cell 1999).

Die Mitglieder der Familie der Nukleären Hormon-Rezeptoren besitzen eine konservierte Domänenstruktur (Abbildung 5, nächste Seite). Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist die am höchsten konservierte Domäne. Sie ist spezifisch für das jeweilige Bindungselement des Promotors. Die DBD enthält zwei hochkonservierte, Cystein-reiche Zinkfinger-Motive (Freedman *et al.* 1988). Durch die Komplexierung von 4 Cysteinresten durch das Zink-Ion ergibt sich die Tertiärstruktur des Zinkfingers. Die Analyse der Kristallstruktur verschiedener DBDs hat ergeben, dass die Zinkfinger durch ihre Interaktion mit der großen Furche der DNA für die sequenzspezifische Interaktion der Nukleären Rezeptoren verantwortlich sind (Luisi *et al.* 1991). Durch intensive Analyse und Mutation der an den Zinkfingern beteiligten Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die im ersten Zinkfinger enthaltenen Motive (P-Box und DR-Box) für die Sequenz-spezifische Interaktion mit der DNA von großer Bedeutung sind.

Die P-Box bildet zwischen den beiden letzten Cysteinen des ersten Zinkfingers eine Schleife. Sie bestimmt die Spezifität der für verschiedene Untergruppen charakteristischen Bindungselemente. Beispielsweise erlaubt die charakteristische P-Box der Nukleären Rezeptoren GR, MR, AR und PR den Rezeptoren, ihr Bindungselement AGAACA zu erkennen. Diese Rezeptoren werden daher oft als der GR-P-Box-Gruppe zugehörig bezeichnet (Umesono und Evans 1989; Hsieh *et al.* 1995). Eine zweite Gruppe Nukleärer Rezeptoren, welche RAR, RXR, VDR, TR und ER umfasst, wird als der ER-P-Box zugehörig bezeichnet. Die Aminosäuresequenz der P-Box dieser Gruppe unterscheidet sich deutlich von der GR-P-Box-Gruppe und erkennt spezifisch die DNA-Sequenz AGGTCA (Zilliacus *et al.* 1994). Einige Mitglieder aus der E-Box-Gruppe (RAR, TR und VDR) binden als Heterodimer mit RXR an die sogenannten asymmetrischen Bindungselemente ‚direct repeats‘ (DRs). Der Abstand (spacing) zwischen den beiden Elementteilen ist für die verschiedenen Dimer-Kombinationen spezifisch und vermittelt somit die Rezeptorspezifität dieser Bindungselemente (Forman und

Samuels 1990; Umesono *et al.* 1991). Vergleiche der DBDs der Rezeptoren TR, RAR und VDR führten zur Entdeckung der DR-Box, welche zwischen dem 2. und dem 3. Cystein des ersten Zinkfingers lokalisiert ist. Dieses kurze Motiv bildet ein asymmetrisches Dimerisierungs-Interface, dessen Aminosäuresequenz von großer Wichtigkeit für die Unterscheidung zwischen den verschiedenen DR-Bindungselementen ist (Perlmann *et al.* 1993). Die D-Schleife oder auch D-Box ist eine weitere wichtige Aminosäuresequenz, welche für die Dimerisierung der Steroid-Rezeptoren von Bedeutung ist. Sie besteht aus einer kurzen Peptidsequenz zwischen dem ersten und dem zweiten Cystein des zweiten Zinkfingers. Durch Ermittlung der Kristallstruktur und durch Mutationsanalysen wurde herausgefunden, dass zwei geladene Aminosäuren in der D-Schleife intermolekulare Salzbrücken ausbilden (Luisi *et al.* 1991). Mutation einer Aminosäure in die entgegengesetzte Ladung führt zu einer Zerstörung des Interfaces und damit zum Verlust der Aktivierung auf dem DNA-Bindungselement. Interessanterweise kommt es bei multiplen Elementen zu einer erhöhten Aktivität (Kaspar *et al.* 1993).

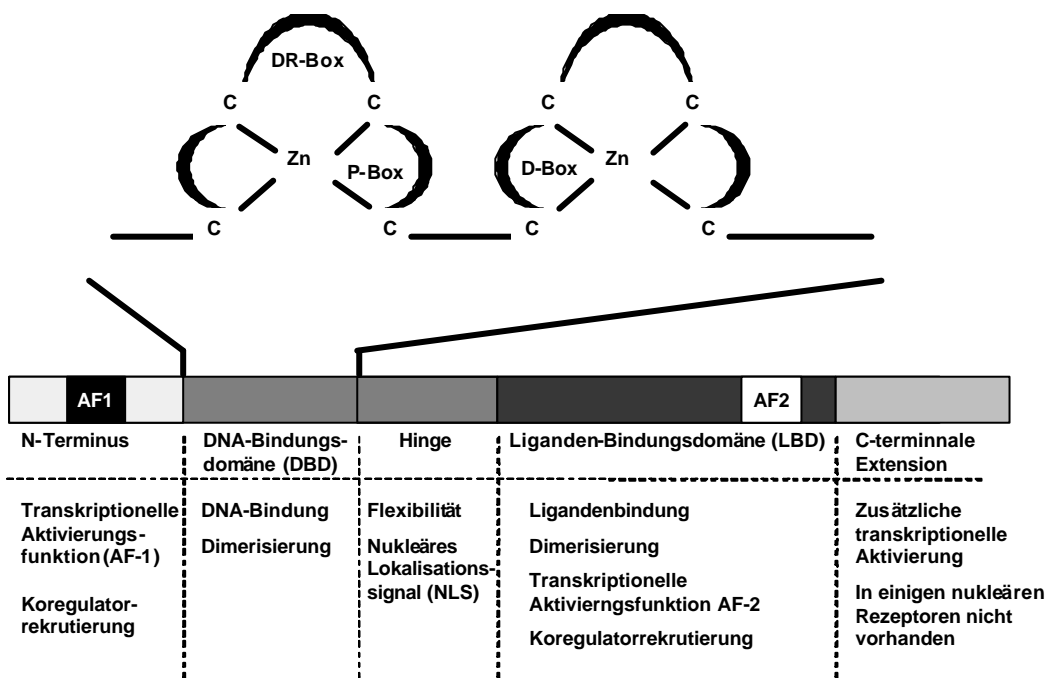


Abbildung 5: Struktur der Nukleären Rezeptoren (Novac und Heinzel 2004)

Die Domänenstruktur der Nukleären Rezeptoren besteht aus der N-terminalen Aktivierungsfunktion, der DNA-Bindungsdomäne, der Hinge-Region, der C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne, welche die Aktivierungsfunktion 2 enthält, und der C-terminalen Domäne. Die charakteristischen Funktionen der einzelnen Domänen sind in der Abbildung aufgelistet. Die DNA-Bindungsdomäne ist mit den beiden Zinkfingern ausführlicher dargestellt. Die Position der DR-Box, der P-Box und der D-Box sind innerhalb der entsprechenden Peptidschleifen angegeben.

Die Region zwischen DBD und LBD wurde lange Zeit für ein flexibles Scharnier gehalten (,hinge'). Nähere Analysen zeigten jedoch, dass diese Region in vielen Nukleären Rezeptoren ein Nukleäres Lokalisationssignal (NLS) enthält und dass Teile dieser Region hochkon-

serviert sind und noch zur DBD bzw. LBD gehören. Mutationen in diesen Regionen, die im Zusammenhang mit der Tumorentstehung stehen zeigen, dass diese Region von größerer Bedeutung zu sein scheint, als bisher angenommen wurde (Novac und Heinzl 2004).

Der C-Terminus der Nukleären Rezeptoren enthält die Liganden-Bindungsdomäne, welche eine deutlich geringere Konservierung aufweist als die DBD. 1995 konnten erstmals die LBDs von apo-RXR α und den liganden-gebundenen (holo) Rezeptoren RAR α und TR mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Bourguet *et al.* 1995a; Renaud *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1995). Der Vergleich der Rezeptoren zeigte, dass die LBDs strukturell gleich aufgebaut sind. Die LBD bildet eine definierte globuläre Struktur mit 11 bis 12 α -Helices, welche in einer antiparallelen dreilagigen Sandwich-Struktur aufgebaut sind. Neben den α -Helices enthält die LBD auch 2-4 β -Faltblätter (Wurtz *et al.* 1996). Die LBD des Glucocorticoid-Rezeptors besteht aus 12 Helices und einem β -Faltblatt (Bledsoe *et al.* 2002). Diese Rahmenstruktur und die Struktur und Lage aller nicht an der Ligandenbindung beteiligten Helices ist bei den meisten Nukleären Rezeptoren identisch. Der Ligand bindet in einer hydrophoben Tasche, die sich im Zentrum der LBD befindet. Die holo-Struktur des Rezeptors ist deutlich kompakter als die apo-Struktur vor der Ligandenbindung (Bourguet *et al.* 2000). Der Ligand wird durch seine Bindung zu einem integrierten Bestandteil der hydrophoben Tasche und stabilisiert die dreidimensionale Struktur des holo-Rezeptors (Borngraeber *et al.* 2003). Im C-terminalen Bereich der LBD befindet sich ein stark konservierter Bereich der eine amphipatische Helix ausbildet. Dieser Bereich ist für die liganden-abhängige Aktivierung der Transkription wichtig und wird deshalb AF-2 (activation function 2) genannt (Danielian *et al.* 1992; Barretino *et al.* 1994; Durand *et al.* 1994). Für die Helix 12 wurde im Rahmen der Röntgenstrukturanalysen in vielen verschiedenen Positionen ermittelt (Renaud und Moras 2000; Kallen *et al.* 2002; Shiau *et al.* 2002; Downes *et al.* 2003; Watkins *et al.* 2003). Daraus hat man geschlossen, dass dieser C-terminalste Bereich der LBD als eine Art molekularer Schalter wirkt, dessen Position in Abhängigkeit von der Ligandenbindung verändert wird (Bourguet *et al.* 1995b; Nolte *et al.* 1998). Die Position der Helix 12 unterscheidet auch zwischen der Bindung eines Agonisten oder eines Antagonisten. Die meisten Agonisten passen in die Ligandenbindungstasche und induzieren eine aktivierend wirkende Konformationsänderung der LBD. Antagonisten hingegen zerstören entweder die Struktur der LBD, oder ändern die Position von Helix 12, so dass keine Koregulatoren und Chromatin-modifizierenden Faktoren mehr binden können. Man geht davon aus, dass die Aktivierung der AF-2 auf einem dynamischen Gleichgewicht verschiedener Konformationen der Helix 12 beruht und dass eine Änderung des Gleichgewichts in Richtung aktiverer Helix 12-Konformationen zu der Kofaktorrekrutierung und damit zur Genaktivierung führt (Shiau *et al.* 2002). Wenn ein Agonist gebunden hat, plaziert sich Helix 12 neben Helix 3 und Helix 11 und bildet so einen Teil der hydrophoben Koaktivator-Bindungsstelle, die dann einen Koaktivator mit einem LXXLL-Motiv re-

krutieren kann. Das Leucin-reiche LXXLL-Motiv ist in einer oder mehreren Kopien in vielen transkriptionellen Kofaktoren vorhanden. In den Koaktivatoren der Nukleären Rezeptoren (NcoAs) sind drei dieser LXXLL-Motive enthalten. Man geht davon aus, dass diese eine Verbindung zu dem Dimer des Nukleären Rezeptors überbrücken (Westin *et al.* 1998). In Analogie zu den bereits kristallisierten apo-Rezeptoren geht man davon aus, dass sich auch bei dem GR nach der Ligandenbindung die Konformation der LBD bei den Helices 10, 11 und 12 ändert und so dafür sorgt, dass der Ligand Zugang findet. Durch die Interaktion zwischen den Helices 3 und 12 bildet sich dann eine neue Proteinoberfläche, welche die Interaktion mit Kofaktoren ermöglicht.

Unter den bekannten natürlichen Liganden der Nukleären Rezeptoren befinden sich eine Vielzahl chemisch unterschiedlicher Substanzen wie Steroide, Thyroide, Retinsäuren, Eicosanoide und Fettsäuren. Cholesterol ist die Ausgangssubstanz zur Synthese von Steroidhormonen, und Retinsäuren werden aus β -Carotin hergestellt. Eicosanoide sind Produkte des Fettsäure-Metabolismus und das Thyroidhormon Tri-iodothyroin wird aus iodierten Tyrosinen gebildet. Trotz ihrer chemischen Unterschiede passen all diese Liganden in die hydrophobe Bindungstasche der Ligandenbindungsdomäne ihres jeweiligen Nukleären Rezeptors. Strukturanalysen der LBDs verschiedener Nukleärer Rezeptoren ergaben, dass der Ligand vollständig vom Protein umhüllt wird und eine wichtige Rolle bei der Bildung der aktiven Konformation des Rezeptors spielt (Renaud *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1995; Brzozowski *et al.* 1997).

1.2.2. Transkriptionelle Repression

Die Korepressoren SMRT und NCoR besitzen mehrere konservierte Repressionsdomänen, die für die Interaktion mit Histondeacetylasen (HDAC) oder HDAC-enthaltenden Komplexen wie Sin3A verantwortlich sind (Heinzel *et al.* 1997; Nagy *et al.* 1997). In den letzten Jahren wurden einige weitere Korepressorkomplexe sowohl mit als auch ohne HDAC-Aktivität beschrieben. Komplexe mit HDAC-Aktivität enthalten Sin3, NuRD oder CoREST. Man geht davon aus, dass die Wahl des Komplexes vom jeweiligen Promotor oder auch vom Zelltyp abhängt. Einige weitere Korepressoren wie Alien, L-CoR, Ikaros oder RIP140 reagieren auf HDAC-Inhibitoren entweder nur teilweise oder gar nicht (Dressel *et al.* 1999; Fernandes *et al.* 2003; Teyssier *et al.* 2003). Der Mechanismus der von HDAC-Aktivität unabhängigen Komplexe wurde noch nicht aufgeklärt, könnte aber das C-terminale Bindungsprotein (CtBP) involvieren. CtBP interagiert mit Polycomb-Genkomplexen (PcG), welche in die stabile Repression der Genexpression involviert sind (Dahiya *et al.* 2001).

Die Korepressoren N-CoR und SMRT enthalten je zwei Domänen für die Interaktion mit Nukleären Rezeptoren („nuclear receptor interaction domains“). Diese Domänen beinhalten das charakteristische Motiv LXXXIXXX(I/L), das auch als CoRNR-Box bezeichnet wird. Die Nu-

kleären Rezeptoren haben unterschiedliche Präferenzen bezüglich der CoRNR-Boxen 1 und 2 (Hu und Lazar 1999; Hu *et al.* 2001). Die LXXXIXXX(I/L)-Sequenz bildet wie die LXXLL-Erkennungssequenz der Koaktivatoren eine α -Helix aus, welche jedoch um eine Helixwindung verlängert ist. Genau dieser verlängerte Abschnitt verhindert die Bindung an den Nukleären Rezeptor in Agonisten-Konformation, denn Helix 12 blockiert durch ihre Position an genau dieser Stelle die Bindung des Korepressors. Da die beiden Korepressoren N-CoR und SMRT neben den Nukleären Rezeptoren auch Transkriptionsfaktoren wie Mad, Pit-1 und CBF-1 binden können, geht man davon aus, dass es auch noch weitere Bindungsmechanismen geben muss (Heinzel *et al.* 1997; Kao *et al.* 2000). Durch biochemische Aufreinigung konnte gezeigt werden, dass sowohl SMRT als auch N-CoR in großen Proteinkomplexen von ca. 1,5 -2 MDa vorliegen können (Li *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2002; Yoon *et al.* 2003). Die Histondeacetylase 3 (HDAC3) ist in diesen Komplexen besonders stark assoziiert. Jeder dieser Komplexe besteht aus etwa 10-12 Proteinen, von denen einige wie TBL1/TBLR1 an Chromatin binden und damit HDAC3 in die unmittelbare Nähe seines Substrats bringen.

Ein weiterer gut charakterisierter Proteinkomplex, der in die Repression durch Nukleäre Rezeptoren involviert ist, ist der ATP-abhängige Komplex NuRD („nucleosome remodelling and deacetylase“). Die Chromodomäne des NuRD-Proteins bindet spezifisch an ein methyliertes Lysin des N-terminalen Histonschwanzes von Histon H3 (Zegerman *et al.* 2002). Der NuRD-Komplex enthält mindestens zwei Histondeacetylasen und interagiert mit dem ER über die Komplex-Komponente MTA1 (Mazumdar *et al.* 2001).

Einige Nicht-Steroid-Rezeptoren reprimieren die Transkription in Abwesenheit ihres Liganden. Der Thyroidhormon-Rezeptor bindet sein entsprechendes Bindungselement auch in Abwesenheit seines Liganden und reprimiert dadurch seine Zielgene. Bindung des Hormons hebt diesen Effekt wieder auf und induziert den Promotor über die Basalaktivität hinaus (Reviews: Saatcioglu *et al.* 1994; Yen 2001).

1.2.3. Post-translatorische Modifikationen

Signaltransduktionswege übermitteln extrazelluläre Signale über Membranrezeptoren und Proteinkinase-Kaskaden an nukleäre Transkriptionsfaktoren, welche dann ihre entsprechenden Zielgene aktivieren. Nukleäre Hormon-Rezeptoren können somit auch auf Informationen von Signaltransduktionswegen reagieren (cross-talk). Alle Komponenten der transkriptionellen Regulation durch Nukleäre Hormon-Rezeptoren werden selbst auch wieder in ihrer Expression reguliert oder sind Ziel post-translationaler Modifikationen. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von TR1 β oder ER α zu einer Potenzierung der transkriptionellen Aktivität. Bei TR1 β führt diese Modifikation zur Dissoziation des Korepressors SMRT und bei ER α zu einer höheren Bindungsaffinität zu dem Koaktivator SRA (Davis *et al.* 2000; Deblois und Giguere 2003). Die Acetylierung des Androgen-Rezeptors führt zu einer verbesserten Bindung

des Koaktivators p300 und damit zu erhöhter Transaktivierung (Fu *et al.* 2003). Die Phosphorylierung der Korepressoren NCoR und SMRT führt dazu, dass sich die Rezeptoren zumindest zeitweise im Zytoplasma befinden (Hong und Privalsky 2000; Hermanson *et al.* 2002).

1.2.4. Regulation der Transkription durch Chromatin-Modifikationen

Man unterscheidet zwei Gruppen chromatin-assoziiierter Proteine, die hochkonservierten globulären Histone und die Nicht-Histon-Proteine. Das Nukleosom, die Struktureinheit des Chromatins, besteht aus 146 Basenpaaren DNA, die um ein Histonoktamer gewunden sind. Ein Histonoktamer besteht aus jeweils zwei Molekülen der Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Arents *et al.* 1991; Luger *et al.* 1997). Die hydrophilen N-terminalen Bereiche der Core-Histone (Abbildung 6) sind aufgrund ihrer flexiblen Struktur für chromatinmodifizierende Enzyme leicht zugänglich und werden daher auch als Histonschwänze bezeichnet (Luger und Richmond 1998). Jedes Nukleosomen ist durch die sogenannte Linker-DNA, an die wiederum ein Histon H1 und HMG Proteine binden, von dem nächsten Nukleosom separiert (Hill 2001). Die DNA wird durch das Core-Histonoktamer und das Linker-Histon H1 zwischen den Nukleosomen verpackt und bildet Chromatinketten, welche ihrerseits in eine höhere Chromatinstruktur verpackt werden (Horn und Peterson 2002).

Die äußerst dynamische Chromatinstruktur ist besonders an den exponierten Seitenketten der Histon-N-Termini das Ziel vieler posttranslationaler Modifikationen (Abbildung 6). Zu diesen kovalenten Modifikationen zählen die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung (Cheung *et al.* 2000; Strahl und Allis 2000). Durch Acetylierung der Lysinreste der Histonschwänze kommt es zu einer veränderten ionischen Ladung des Histon N-Terminus und damit zu einer Lockerung der Chromatinstruktur (Jenuwein und Allis 2001). Das Lysin ist Ziel unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen. Diese sind entweder reversibel (Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung) oder besitzen einen permanenten Status (Methylierung). Ein einzelnes Lysin kann lediglich durch eine Modifikation verändert werden, jedoch können in einem Protein verschiedene Lysine unterschiedliche Gruppen tragen (Jenuwein und Allis 2001).

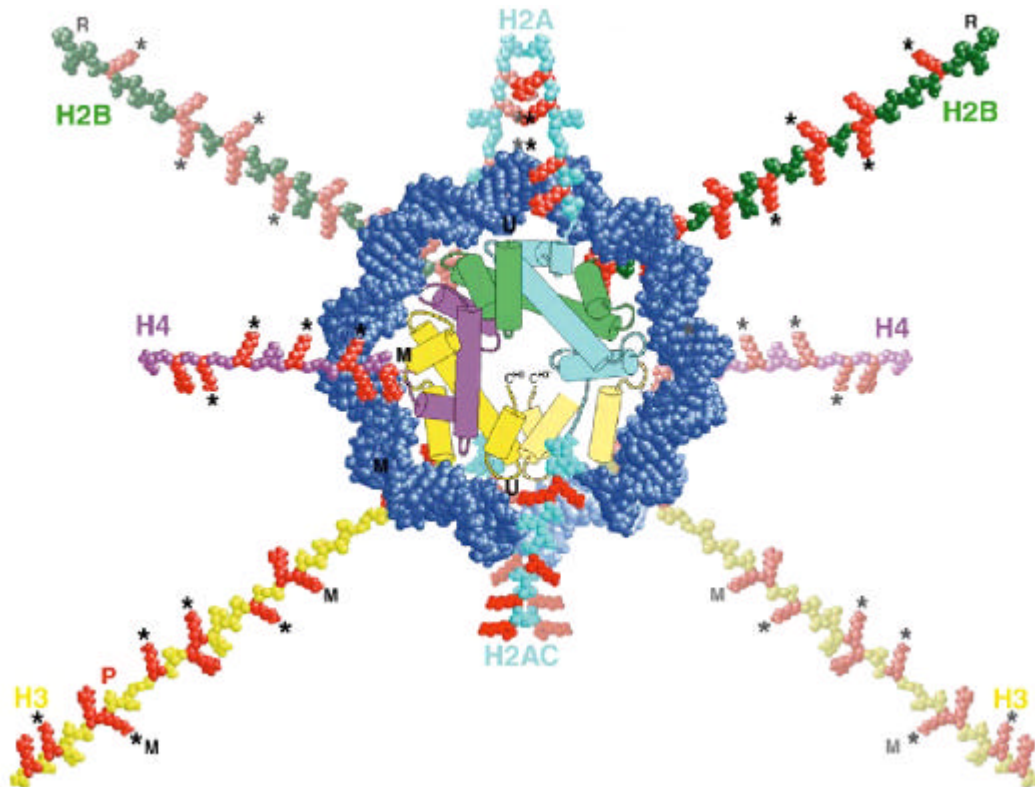


Abbildung 6: Posttranslationale Modifikationen an Histon-N-Termini

Dargestellt ist die DNA (dunkelblau), die um ein Histonoktamer gewunden ist. Die Histone sind in verschiedenen Farben dargestellt (die α -Helices als Säulen), die Histonschwänze ragen in der Abbildung aus der DNA-Schleife hinaus. Die Arginin- und Lysinreste der Histonschwänze sind in rot dargestellt. Histonmethylierung (M) kann sowohl an einem Arginin als auch an einem Lysin erfolgen, Acetylierung (*) und Ubiquitinierung (U) erfolgen ausschließlich an Lysin, ADP-Ribosylierung und Phosphorylierung (P) an Serinen der Histon-N-termini. Die Lysine der Histone H3 und H4 sind ein häufiges Ziel posttranslationaler Modifikation, besonders von Acetylierung und Methylierung. Diese Modifikationen treten auch an Histon H2A und H2B auf (Wolffe und Hayes 1999).

Die kondensierte Chromatinstruktur der eukaryontischen DNA (Abbildung 7) erschwert den Zugang vieler Transkriptionsfaktoren zu ihren Bindungselementen (Orphanides und Reinberg 2000). Nukleäre Rezeptoren können im Unterschied zu anderen Transkriptionsfaktoren auch an kondensiertes Chromatin binden und nehmen so eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der Genaktivierung ein, da sie die Chromatinstruktur lockern und somit die Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren freilegen (Collingwood *et al.* 1999; Deroo und Archer 2001; Hsiao *et al.* 2002; Hebbar und Archer 2003).

Die Enzyme zur Veränderung der Chromatinarchitektur werden zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet, den ATP-abhängigen chromatinmodifizierenden Komplexen (CRCs) und den Histon-modifizierenden Proteinen. Erstere benötigen ATP zur Veränderung der Chromatinstruktur (Becker und Hörz 2002). Die CRCs sind Multiproteinkomplexe, die aufgrund der jeweiligen vorhandenen ATPase in die drei Familien Swi/Snf, ISWI und Mi-2/NURD zusammengefasst werden (Becker und Hörz 2002). Der Mi-2/NURD Komplex besitzt zusätzlich Hi-

stondeacetylaseaktivität und verbindet daher die beiden Strategien ‚ATP-abhängige Chromatinmodifizierung‘ und ‚Histonmodifikation‘ (Guschin *et al.* 2000). Histone unterliegen einer Vielzahl posttranslationaler Modifikationen.

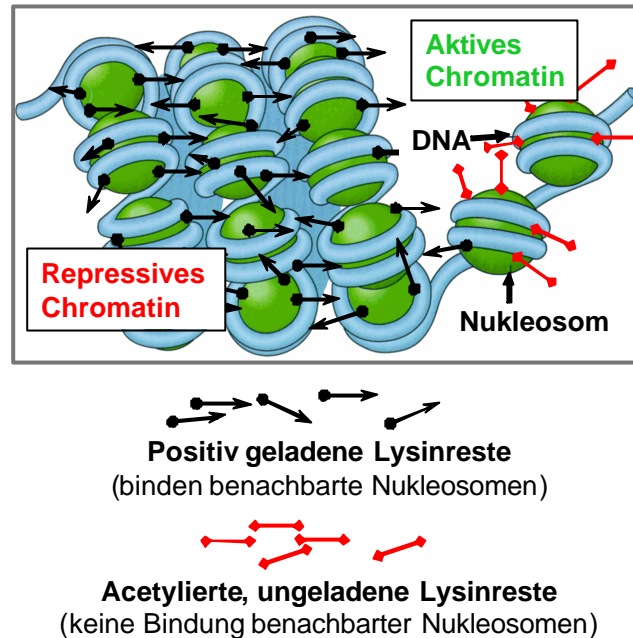


Abbildung 7: Veränderung der Chromatinstruktur durch Histonmodifikation

Acetylierung und Deacetylierung von Histonen führen zu einer lokalen Veränderung der Chromatinstruktur. Der Verlust der Acetylgruppen an Lysin-Aminosäuren im Histon bedingt eine kompaktere Chromatinstruktur, die es benachbarten Nucleosomen erlaubt, elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen.

Die Acetylierung und Deacetylierung von Core-Histonen ist ein wichtiger und intensiv studierter Mechanismus der Histonmodifizierung. Während aktives Chromatin hyperacetylierte Histone enthält, korreliert die Deacetylierung mit inaktiven Chromatin (Grunstein 1990; Turner 1993; Kuo *et al.* 2000; Deckert und Struhl 2001; Khochbin *et al.* 2001). Der Grad der Histonacetylierung in der Promotorregion wird durch die Rekrutierung von Koregulatorkomplexen und von den jeweils assoziierten enzymatischen Aktivitäten der Histonacetyl-Transferasen (HATs) oder Histondeacetylasen (HDACs) reguliert (Struhl 1998).

Drei HAT Familien wurden identifiziert: Die GNAT (SAGA/PCAF/Gcn5), die MYST (NuA4/TIP60), und die p300/CBP Familie (Brown *et al.* 2000; Narlikar *et al.* 2002). Die verschiedenen HATs sind in unterschiedlichen Komplexen enthalten und acetylieren neben den Core-Histonen auch Nicht-Histon-Proteine.

HDACs können aufgrund ihrer Homologie zu den korrespondierenden Proteinen der Hefe in drei Klassen eingeteilt werden. Klasse I HDACs (HDAC1, 2, 3, und 8) sind dem Hefe RPD3-Protein homolog. Sie sind konstitutiv im Nucleus lokalisiert. Die HDACs der Klasse II (HDAC4, 5, 6, 7, 9, und 10) zeigen Homologie mit dem Hefeprotein HDA1 und können so-

wohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert sein. Die dritte Klasse HDACs umfasst eine strukturell andere Klasse von NAD-abhängigen Enzymen, die Ähnlichkeit mit dem SIR2- (silent information regulator 2) Protein der Hefe aufweisen (Vidal und Gaber 1991; Rundlett *et al.* 1996; Gottschling 2000; Imai *et al.* 2000; Landry *et al.* 2000; Smith *et al.* 2000; Gray und Ekstrom 2001; Thiagalingam *et al.* 2003).

Je nachdem, welche posttranslationalen Modifikationen der Core-Histone an welchen Aminosäuren vorliegen, ergibt sich ein bestimmter Histonkode, der von spezifischen Proteinen erkannt wird. Strahl und Allis entwickelten diese Hypothese des Histonkodes (Strahl und Allis 2000). Die Methylierung der Histonschwänze ist eine sehr stabile Modifikation, welche die Bindung von Proteinen mit einer Chromodomäne ermöglicht. Für das Protein HP1 (heterochromatin protein I) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es spezifisch und selektiv das methylierte Lysin 9 des Histons H3 bindet (Bannister *et al.* 2001). Die Assoziation des HP1-Proteins mit Histonen des Heterochromatin führt zu einer stärker kondensierten Chromatinstruktur und damit zu stark reprimierten Genbereichen. Mittlerweile geht man davon aus, dass auch die Phosphorylierung eines Serins oder Threonins eine Möglichkeit der dynamischen Beeinflussung der Methylierung, und damit der Transkription darstellt.

1.3. Molekulare Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors

1.3.1. Allgemeines

Glucocorticoide können wegen ihrer lipophilen Eigenschaften aus dem Blut direkt durch die Zellmembranen im Körper diffundieren. In der Zelle binden sie an den Glucocorticoid-Rezeptor. Der GR liegt in der Abwesenheit seines Liganden in einem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex vor. Dieser Komplex besteht unter anderem aus einem Dimer des Hitzeschock-Proteins Hsp90, je einem Molekül Hsp70 und p23, und aus Immunophilinen der FK506-bindenden Familie (DeFranco 2002).

Nach der Bindung eines entsprechenden Liganden dissoziiert GR von den Proteinen des Hitzeschock-Komplexes (Abbildung 8). Der aktivierte Rezeptor interagiert mit dem Importinsystem und translokiert in den Zellkern durch die nukleären Poren. Im Zellkern aktiviert oder reprimiert der GR seine Zielgene entweder durch direkte DNA-Bindung an spezifische Erkennungssequenzen (Cis-Aktivierung/-Repression) oder durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B, AP-1, NF-AT or STAT5 und Modulation ihrer Aktivität (Trans-Aktivierung/-Repression) (Pfahl 1994; Stöcklin *et al.* 1996; Stöcklin *et al.* 1997; Newton 2000; Almawi und Melemedjian 2002; Franchimont *et al.* 2003).

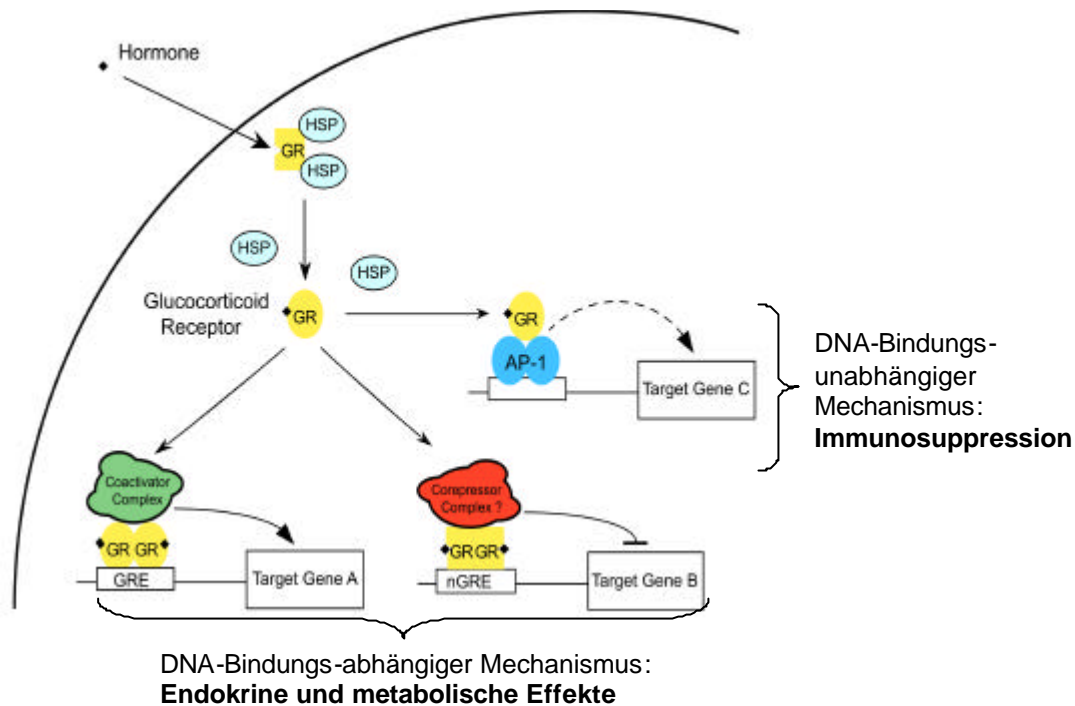


Abbildung 8: Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors (Dostert und Heinzel 2002)

GR aktiviert oder reprimiert seine Zielgene entweder durch direkte DNA-Bindung an spezifische Erkennungssequenzen (Cis-Aktivierung/-Repression), oder durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren wie $\text{NF-}\kappa\text{-B}$, AP-1, NF-AT or STAT5 und Modulation von deren Aktivität (Zielgen C). Bei der DNA-abhängigen Modulation unterscheidet man die Cis-Aktivierung durch positive GR-Bindungs-elemente (GREs, Zielgen A), und die Cis-Repression durch negative GR-Bindungs-elemente (nGREs, Zielgen B). Bisher geht man davon aus, dass die Nebenwirkungen der Glucocorticoid-Therapie (endokrine und metabolische Effekte) über die DNA-bindungsabhängigen Mechanismen vermittelt werden, während die anti-inflammatorischen Effekte über den Mechanismus der Transrepression von AP-1 und $\text{NF-}\kappa\text{-B}$ vermittelt werden.

Obwohl der GR bevorzugt Homodimere bildet, konnten auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren aus der Klasse der Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen werden. Die Bildung dieser Heterodimere hängt von dem Ligandenbindungsstatus und von der Gewebespezifischen Expression der entsprechenden Rezeptoren ab. Heterodimere mit GR konnten für den Androgen- (Chen *et al.* 1997) und für den Mineralocorticoid-Rezeptor (Funder 1993), (Trapp und Holsboer 1996; Calle *et al.* 2003) nachgewiesen werden.

Der humane Glucocorticoid-Rezeptor besteht aus drei Hauptdomänen (Abbildung 9): Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1 bis 420) enthält die Aktivierungsdomäne AF-1 (activation function 1 oder auch $\tau 1$). Aminosäuren 421 bis 486 umfassen die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die zwei Zinkfinger-Motive enthält. Die Anordnung der Aminosäuren im sogenannten D-loop des Zinkfingers ermöglichen die Dimerisierung des Rezeptors auf der DNA. Die Aminosäuresequenz der DBD ist für die spezifische DNA-Sequenzerkennung des Rezeptors verantwortlich. Die C-terminale Domäne des Glucocorticoid-Rezeptors enthält die Ligandenbindungs-Domäne (LBD). Sie umfasst die Aminosäuren 528 bis 777 (Picard und Yamamoto 1987; Müller und Renkawitz 1991). Die Region zwischen der DBD und LBD

1987; Müller und Renkawitz 1991). Die Region zwischen der DBD und LBD (Aminosäuren 487-527) wird ‚hinge‘ (Scharnier)-Region genannt.

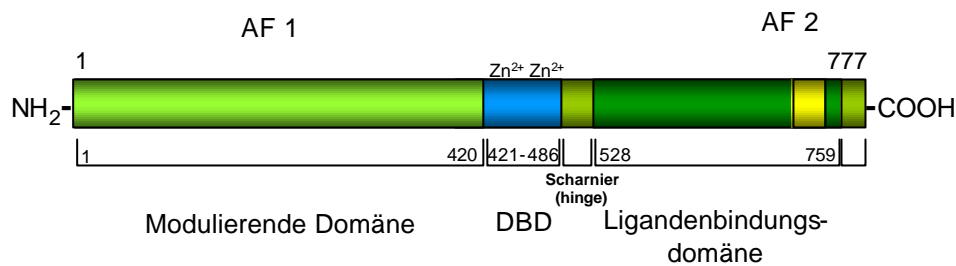


Abbildung 9: Domänenstruktur des Glucocorticoid-Rezeptors

Die Ligandenbindungs-Domäne ist neben der GC-Bindung auch an der Rezeptor-Dimerisierung, der transkriptionellen Regulation, und (wegen eines Nukleären Lokalisationssignals, NLS) am Kerntransport des GR beteiligt. Ein weiteres NLS liegt direkt neben der DNA-Bindungs-Domäne. Die DBD vermittelt die spezifische Interaktion mit den DNA-Bindungselementen; die Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 sind für die Regulation der Transkription verantwortlich. Die N-terminale Domäne ist an der Unterscheidung zwischen verschiedenen Zielgenen durch Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren beteiligt (Greenstein *et al.* 2002).

Es gibt zwei alternative Splicingformen des GR, GR α and GR β . Die ersten 727 Aminosäuren sind für beide Rezeptoren identisch, der C-Terminus hingegen besteht aus 50 (GR α) bzw. 15 (GR β) Aminosäuren. GR β ist konstitutiv im Nukleus lokalisiert und nicht in der Lage, GCs zu binden. Obwohl der Rezeptor damit transkriptionell inaktiv ist, wird angenommen, dass GR β auf positiven GREs als dominant-negativer Inhibitor wirkt, indem er als Heterodimer mit GR α an positive GREs bindet und somit die Genaktivierung verhindert. (Schaaf und Cidlowski 2002; Leung und Bloom 2003). Es gibt keine Hinweise dafür, dass GR β die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B verändert (Schaaf und Cidlowski 2002). Vermutlich steht die erhöhte Expression von GR β mit dem Phänomen der Steroidresistenz im Zusammenhang, welche manchmal bei langfristiger GC-Therapie auftritt (Bamberger *et al.* 1995; Leung und Bloom 2003).

1.3.2. Mausmodelle zur Analyse des GR-Mechanismus

Bei der Erforschung der Wirkungsweise von Glucocorticoiden haben sich Mausmodelle als sehr hilfreich erwiesen. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Endogene Glucocorticoide spielen eine wichtige Rolle bei der Hemmung von Entzündungen im Körper: Transgene GR-Knockin-Mäuse, die durch ein integriertes ‚yeast artificial chromosome‘ (YAC) mehr Glucocorticoid-Rezeptor exprimieren, sind gegen einen Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten septischen Schock deutlich resistenter als die entsprechenden Wildtyp-Mäuse. Des Weiteren weisen die Thymozyten eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber

Steroiden auf (Reichardt *et al.* 2000). Diese Ergebnisse deuten auf die Rolle der GCs bei der Hemmung von Entzündungsreaktionen hin.

GR-Knockout-Mäuse ($GR^{-/-}$) sterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt an Atemwegsversagen. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass der GR zum Überleben essenziell ist (Cole *et al.* 1995). Die Mäuse zeigen einige weitere schwere Störungen wie z.B. Atelektase der Lunge, veränderte Expression von Enzymen der Gluconeogenese, De-Repression der HPA-Achse, Hyperplasie der Nebennierenrinde und Verlust der Glucocorticoid-abhängigen Thymozyten-Apoptose und gestörte Proliferation der Vorläuferzellen der erythroiden Linie.

GR mit einer Punktmutation in der D-Schleife der DNA-Bindungsdomäne (A458T, GR^{dim} , Abbildung 10) kann nicht mehr dimerisieren und deshalb auch nicht mehr als Homodimer an DNA binden (Cis-Repression) (Heck *et al.* 1994). Da die Mechanismen der Trans-Repression und Trans-Aktivierung keine DNA-Bindung benötigen, kann diese Mutante somit zwischen DNA-bindungsabhängigen und -unabhängigen Mechanismen unterscheiden (Abbildung 11). $GR^{dim/dim}$ -Mäuse enthalten diese Punktmutation. Im Gegensatz zu $GR^{-/-}$ -Mäusen sind sie lebensfähig, fruchtbar und zeigen keinerlei Anzeichen für eine gestörte Lungenreifung (Reichardt *et al.* 1998).

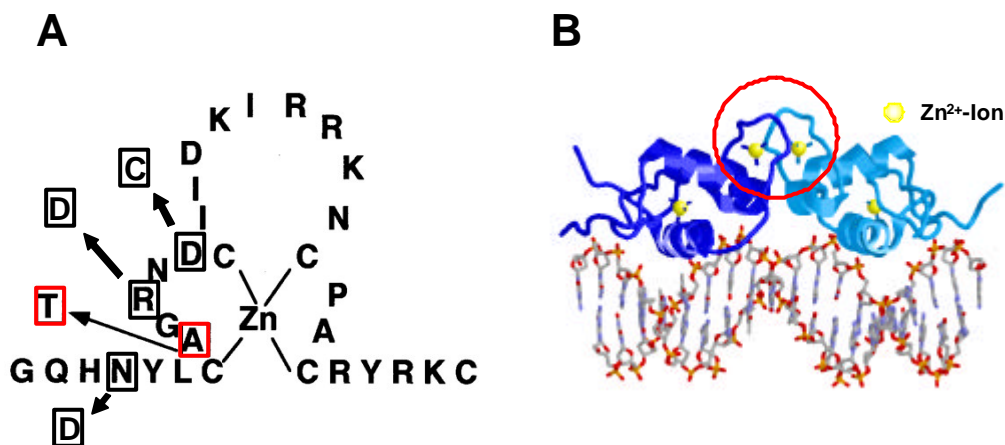


Abbildung 10: Die verschiedenen Aminosäure-Mutationen in der D-Schleife der DBD

Die D-Schleife der DNA-Bindungsdomäne des GR ist für die Dimerisierung von großer Wichtigkeit. Abbildung A zeigt die Aminosäuresequenz des Zinkfingers und die eingeführten Punktmutationen in der D-Schleife (N = Asparagin, A = Alanin, R = Arginin, D = Aspartat, T = Threonin, C = Cystein). Die rot markierte Mutation ist die A458T-Mutation der $GR^{dim/dim}$ -Mäuse, die schwarz markierten Mutationen zeigen die drei zusätzlichen Punktmutationen der GR^{dim4} -Mäuse. Abbildung B zeigt zwei DNA-Bindungsdomänen des GR (dunkel- und hellblau), welche an die DNA binden und über ihre beiden ersten Zinkfinger (rot eingekreist) dimerisieren. In der LBD befindet sich eine zweite Dimerisierungsfunktion, welche jedoch alleine für die Dimerisierung des GR nicht ausreicht.

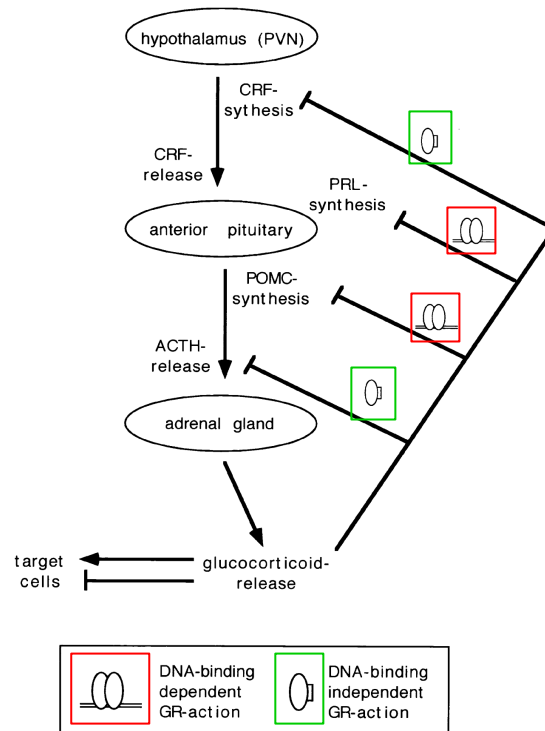


Abbildung 11: Die HPA-Achse (Reichardt *et al.* 1998)

Die vergleichende Analyse von GR^{wt} - und $GR^{dim/dim}$ -Mäusen gibt Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen der Repression der HPA-Achse. Während die CRF-Synthese und die Freisetzung von ACTH über einen Monomer-Mechanismus (Trans-Repression, grün markiert) reguliert werden, sind die Synthese von POMC und PRL in $GR^{dim/dim}$ -Mäusen stark verändert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich um Cis-Repression (rot markiert) handeln muss.

In vitro-Daten haben gezeigt, dass drei zusätzliche Punktmutationen (N454D, R460D und D462C, Abbildung 10) in der Dimerisierungs-Domäne des GR die DNA-Bindung effektiv verhindern, und dass die Trans-Repression nicht verhindert wird. Die entsprechenden GR^{dim4} -Knockin-Mäuse sind erstaunlicherweise nicht lebensfähig und sterben vor ihrer Geburt. Die aus diesen Mäusen etablierten embryonalen Fibroblasen (MEFs) wurden mit verschiedenen Luciferase-Konstrukten analysiert und es konnte festgestellt werden, dass die Trans-Repression in dieser Maus wider Erwarten nicht mehr funktioniert. Interessanterweise kann der GR in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Man geht derzeit davon aus, dass das GR^{dim4} -Protein schneller abgebaut wird als der Wildtyp-GR und dass die GR^{dim4} -Mäuse aus diesem Grund den gleichen Phänotyp wie die $GR^{-/-}$ -Mäuse aufweisen. (Rogers *et al.* 2004)

1.4. Transrepression

Wie bereits erwähnt wurde, kann der Glucocorticoid-Rezeptor die Transkription als Monomer durch Protein-Protein-Interaktionen modulieren. In Interaktionen mit Spi-1 (Gauthier *et al.* 1993), AP-1 (s. unten) NF- κ B (s. unten) Oct-1 (Kutoh *et al.* 1992), CREB (Imai *et al.* 1993), und Gata-1 (Chang *et al.* 1993) wirkt der GR als Repressor. Dabei verhindert GR entweder

die DNA-Bindung anderer Transkriptionsfaktoren (Newton *et al.* 1998; Ray und Prefontaine 1994), oder reprimiert deren Aktivität ohne Beeinträchtigung ihrer DNA-Bindung (De Bosscher *et al.* 1997; Nissen und Yamamoto 2000). Durch Interaktion mit STAT5 kann der GR zudem als positiver Transkriptionsfaktor wirken (Trans-Aktivierung, Stöcklin *et al.* 1996). Des Weiteren wird die Konkurrenz mit Koaktivator-Proteinen als Mechanismus der GR-vermittelten Trans-Repression diskutiert (Kamei *et al.* 1996; Sheppard *et al.* 1998). Somit besitzt GR neben seiner Rolle als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor eine zweite Funktion als negativer Regulator anderer Transkriptionsfaktoren. Letztere Funktion ist unabhängig von der DNA-Bindung des GR, und die Zink-Finger-Domäne ist hierfür nicht essenziell (Herrlich 2001).

AP-1 (Aktivator Protein 1) besteht aus einer Familie miteinander dimerisierender Transkriptionsfaktoren, die durch TPA (12-O-Tetradecanoyl-13-Phorbolacetat) induzierbar sind. AP-1 spielt eine zentrale Rolle im Zellwachstum, in der Differenzierung, in der Tumorigenese und in der Entwicklung (Angel und Karin 1991). Die Zusammensetzung der AP-1-Dimere ist sehr heterogen. Der Komplex kann sich aus Mitgliedern der Jun- (c-Jun, JunB und JunD), Fos- (C-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und CREB/ATF-Familie zusammensetzen.

Der Crosstalk zwischen dem Glucocorticoid-Rezeptor und AP-1 wurde vor etwas mehr als 10 Jahren entdeckt. Man geht davon aus, dass dieser Mechanismus neben der Transrepression von NF- κ B für viele Effekte der GCs auf das Immunsystem verantwortlich ist (Herrlich 2001). Die therapeutisch wichtigste Funktion der Glucocorticoide ist ihre anti-inflammatorische und ihre immunsuppressive Wirkung, die durch Inhibierung der Synthese von Zytokinen und Chemokinen, und durch die Repression von Genen verschiedener Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle (die für die Rekrutierung und Migration der Lymphozyten wichtig sind) zustande kommt. Das Aufheben der Wirkung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor führt zur Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül I, dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül I und E-Selektin (Barnes und Karin 1997). Für den Crosstalk spielen die klassischen Korepressoren (wie SMRT oder N-CoR) keine Rolle, da NF- κ B und AP-1 erst nach dem Aufbau des Prä-Initiationskomplexes inhibiert werden (Nissen und Yamamoto 2000).

Eine regulative Wirkung von GCs auf die mRNA-Stabilität wurde z.B. für Interleukin 8 (IL-8) und die Cyclooxygenase 2 (Cox-2) gezeigt (Chang *et al.* 2001; Lasa *et al.* 2001). Der genaue Mechanismus der Regulation der mRNA-Stabilität durch Glucocorticoide ist nicht vollständig geklärt. Beschrieben wurde eine mögliche Rolle des sogenannten Destabilisierungsmotivs AUUUA im 3' UTR (3' untranslated region, Region zwischen dem Stop-Codon der Translation und dem Start des Poly-A-Schwanzes der mRNA) der Transkripte. Jedoch kann dieser Effekt auch indirekt vermittelt werden. So können Glucocorticoide z.B. direkt die Proteinkina-

se p38 inhibieren, was zu einer Destabilisierung der IL-8-mRNA führt (Lasa *et al.* 2001).

1.5. Positive Glucocorticoid-Rezeptor Bindungselements (GREs)

Positive GREs bestehen aus zwei palindromischen 6-Basenpaar-Halbseiten, welche durch 3 Basenpaare voneinander getrennt sind. Die GRE-Konsensussequenz ist 5'-GGTACAnnnTGGTCT-3' (Beato *et al.* 1989). Einige Basen sind strikt konserviert, andere können mutiert werden, ohne dass die Genaktivierung verloren geht (Nordeen *et al.* 1990). Jede Halbseite' des GRE bindet ein GR-Molekül. Die beiden Proteine dimerisieren dann mit Hilfe von Aminosäuren der D-Schleife und der Ligandenbindungsdomäne. Die Bildung eines GR-Homodimers ist nur bei DNA-Kontakt des Rezeptors möglich (Drouin *et al.* 1992). Unter den durch GREs positiv regulierten Genen, befinden sich einige Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), die Tyrosin-Aminotransferase (TAT), die Aspartat-Aminotransferase (AAT) und die Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) (Schäcke *et al.* 2002a). Diese Enzyme aktivieren die Gluconeogenese bei Stress und sind für die Induktion von Diabetes Mellitus bei längerer GC-Therapie verantwortlich, da Glucocorticoide als Nebenwirkung zu Kohlenhydrat-Intoleranz führen können.

Der MMTV-Promoter (mouse mammary tumor virus) hat sich als Modellsystem für die Erforschung der GREs und der Bedeutung der Chromatinstruktur für die Transkription entwickelt. Bereits 1975 wurde dieses Modell erstmals eingesetzt (Ringold *et al.* 1975). Brustkrebs-Zelllinien der Maus sind mit dem mouse mammary tumor-Virus infiziert. Die Behandlung solcher Zelllinien mit einem synthetischen Glucocorticoid führt zu einer schnellen Akkumulation der Virus-spezifischen RNA. Der Promotor dieses Virus wurde sehr detailliert analysiert (Beato 1996). Mit Hilfe eines sogenannten ‚Tandem-Array‘ von mehreren MMTV-Reporterelementen kann man den GFP (green fluorescent protein)-markierten GR auf dem Bindungselement sichtbar machen (Abbildung 12). In FRAP-Experimenten (fluorescence recovery after photobleaching) konnte gezeigt werden, dass der Liganden-gebundene GR sehr schnell seine Position im Zellkern wechselt (McNally *et al.* 2000). Basierend auf diesen Experimenten wurde der sogenannte ‚hit-and-run‘-Mechanismus postuliert. Dabei bindet der Liganden-aktivierte GR an die relativ geschlossene DNA-Chromatin-Struktur, rekrutiert Nucleosomen-Remodeling-Aktivität und löst sich dann sofort wieder von seinem DNA-Element. Es konnte gezeigt werden, dass der GR in Gegenwart von Hitzeschockproteinen eine erhöhte Mobilität aufweist (Nagaich *et al.* 2004a; Nagaich *et al.* 2004b).

In Gegenwart von antagonistischen Liganden wie RU486 reprimieren Steroid-Rezeptoren die Transkription auch dann, wenn sie an positive HREs gebunden sind. Der Glucocorticoid-Rezeptor reprimiert die Transkription in Gegenwart seines Antagonisten RU486, indem er den Korepressor N-CoR rekrutiert (Song *et al.* 2001; Schulz *et al.* 2002).

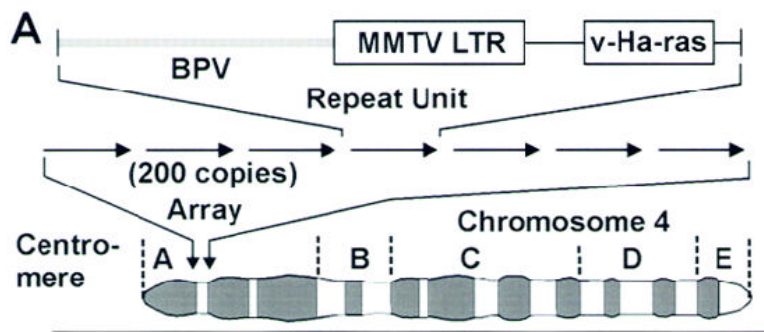


Abbildung 12: MMTV-Tandem Arrays (McNally *et al.* 2000)

Die Zelllinie 3134 enthält im Chromosom 4 einen Tandem Array des MMTV/Harvey viral ras (MMTV/v-Ha-ras)-Reporters. Die wiederholte Struktur entstand durch die spontane chromosomale Integration eines 9-kb BPV (bovine papilloma virus) Multikopie-Episoms. GR wird in dieser Zelllinie als GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines durch Tetracyclin reprimierbaren Promotors exprimiert. Der Tandem Array besteht aus 200 Kopien des MMTV-LTR-ras BPV- Reportergens in einer perfekten ‚head -to-tail‘ - Ausrichtung von $1,8 \times 10^6$ bp. Die Struktur enthält insgesamt 800 bis 1200 Bindungsstellen für den Glucocorticoid-Rezeptor und ist groß genug, um in der Lichtmikroskopie sichtbar zu sein.

1.6. Negative Glucocorticoid-Rezeptor Bindungselemente (nGREs)

Die Transkription wird reprimiert, wenn ein Transkriptionsfaktor an der Interaktion mit dem Transkriptionsinitiationskomplex gehindert wird. Repression umfasst Mechanismen wie z.B. die Konkurrenz um ein gemeinsames Bindungselement oder um einen gemeinsamen Kofaktor, die Bildung inaktiver Komplexe, oder Modulation der Chromatinstruktur durch die Rekrutierung von Korepressoren und Histondeacetylasen (HDAC). (Saatcioglu *et al.* 1994; Strahl und Allis 2000).

Die Genregulation durch negative Bindungselemente wurde neben GR auch für den Thyroidhormon-Rezeptor (TR) und den Retinsäure-Rezeptor (RAR) gezeigt. Hierzu gibt es jedoch nur sehr wenige Studien: Der Oxytocin-Promotor der Ratte wird durch ein negatives RAR-Bindungselement reguliert (Lipkin *et al.* 1992). Das Gen des humanen Matrix Gla Proteins (MGP) wird ebenfalls von einem nHRE der Rezeptoren RAR und RXR reprimiert (Kirkel *et al.* 1997). Dieses nHRE enthält eine CCAAT-Box und wird sowohl vom RAR/RXR-Heterodimer als auch von CCAAT-bindenden Proteinen gebunden (Kirkel *et al.* 1997). Negative Bindungselemente für den Thyroidhormon-Rezeptor (nTREs) wurden in den Genen von Thyrotropin (TSH) und Thyrotropin-freisetzendem Hormon (TRH) charakterisiert (Yen 2001). Für den Glucocorticoid-Rezeptor wurden einige negative Bindungselemente beschrieben. Die zugehörigen Gene werden in Tabelle 1 kurz vorgestellt und im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben. Negative GREs spielen unter anderem in der neuronalen und hormonellen Regulation eine wichtige Rolle (Kapitel 1.7).

Tabelle 1: Übersicht nGREs (Dostert und Heinzl 2004)

Gen	Position des nGRE	Möglicher Mechanismus	Biologische Funktion	Literatur
Alpha-Fetoprotein (AFP)	Zwischen -180 bis +1 für alle analysierten Säugerspezies	GRE-artige Struktur, Spezies-spezifische Regulation, das Element enthält bei Nagern ein DR1-Motif	Hauptkomponente des fetalen Serums bei Säugetieren, außerdem Tumormarker	(Nakabayashi <i>et al.</i> 2001)
Corticotropin releasing hormone (CRH, CRF)	-278 bis -249	nGRE zusätzlich zu Transrepression	GCs hemmen die HPA-Achse durch Repression von CRH	(Malkoski <i>et al.</i> 1997; Malkoski und Dorin 1999)
Glycoprotein Hormon α -Untereinheit	-122 bis -93 (zentrale geschützte Region)	Transkriptionelle Interferenz mit dem cAMP-responsive-enhancer	Gemeinsame Untereinheit von LH, FSH, CG and TSH	(Akerblom <i>et al.</i> 1988)
Interleukin-1 β (IL-1 β)	-570 bis -552	Das nGRE enthält eine Bindungsstelle für AP-2	Entzündungsmediator	(Zhang <i>et al.</i> 1997)
Keratine K5, K6, K14, K16, K17	in der Region von -142 bis -49 für alle Keratine	Ungewöhnliches Multimer-Element, GR bindet als vier Monomere	Wichtiger Hautbestandteil (GCs führen zu Atrophie der Haut)	(Radoja <i>et al.</i> 2000)
Neuronaler Serotonin (5-HT _{1A}) Rezeptor	-1169 bis -1148	GR/MR-Heterodimer, zwei "halfsites" getrennt von 6 Basenpaaren	Schlüsselfunktion im serotoninergen System	(Ou <i>et al.</i> 2001), (Meijer <i>et al.</i> 1997)
Osteocalcin (OC)	-32 bis -17	Sterische Hinderung, das nGRE überlappt mit der TATA box	Nach Kollagen das wichtigste Protein in der Knochenmatrix, trägt zur Osteoporose bei	(Stromstedt <i>et al.</i> 1991), (Meyer <i>et al.</i> 1997b)
Prolactin (Prl)	-247 bis -214	Überlappende Bindungsstellen für Pit-1, Oct-1 und GR	Laktation	(Sakai <i>et al.</i> 1988), (Somasekhar und Gorski 1988)
Proliferin (PLF)	-254 bis -230	cGRE; Interferenz mit AP-1	Angiogenese, speziell in der Plazenta	(Diamond <i>et al.</i> 1990)
Proopiomelanocortin (POMC)	-77 bis -51	Trimer, sterische Hinderung, nGRE überlappt mit einem Nur77-RE	GCs hemmen die HPA-Achse durch Repression von POMC	(Drouin <i>et al.</i> 1993)
Vasoactives intestinales Peptid (VIP) Typ I Rezeptor	-36 bis -21	typisches nGRE	Bronchodilatation, Vasodilatation	(Pei 1996)

Ziel dieser Arbeit ist es, auch die Bedeutung der nGREs (neben der Transrepression) für die Immunmodulation (Kapitel 1.8) zu untermauern. Sequenzvergleich der nGREs zeigte, dass diese Elemente im Gegensatz zu den positiven GREs nur eine mässig stark konservierte Halfsite enthalten (Abbildung 13, Dostert und Heinzl 2002). Darauf wird im Folgenden (Ergebnisse und Diskussion) näher eingegangen.

POMC	C T G C C A	G G A A G G	T C A	C G T C C A	A G G C T C A
Prolactin	C T C A A A	C T A G T C	T C C	A G A T C T	C A C C A T C
α -Fetoprotein	C C C C A A	A G A G C T	C T G	T G T C C T	T G A A C A T
CRH	A A A A A T	T T T T G T	T C A A	T G G A C A	A G T C A T A
Osteocalcin	C C A G A G	G G T A T A	A A C	A G T G C T	G G A G G C T
Interleukin 1 β	T G C C C C	A G C C A A	G A A	A G G T C A	A T T T T C T
Proliferin (plfG)	T G G C T A	C T C A C A	G T A	T G A T T T	G T T T T A G

Abbildung 13: Sequenzvergleich verschiedener negativer GR-Bindungselemente

Negative GREs enthalten im Gegensatz positiven GREs nur eine konservierte Halbseite (grau markiert), die 5'-Halbseite ist praktisch nicht konserviert (gestrichelt eingerahmt). Abbildung modifiziert nach (Dostert und Heinzl 2002).

1.7. Negative GREs in der neuronalen und hormonellen Regulation

1.7.1. Der POMC-Promoter

POMC (Pro-opiomelanocortin) spielt in der Regulation der HPA-Achse eine wichtige Rolle (Abbildung 11, Seite 18). Der POMC-Promoter wird von CRH (Corticotropin-freisetzendes Hormon) und von Glucocorticoiden reprimiert (Aguilera *et al.* 1983; Suda *et al.* 1988). ACTH ist das wichtigste POMC-Genprodukt in kortikotrophen Zellen (Chretien und Seidah 1981; Khoo und Grossman 2003). Der POMC-Promotor enthält gängige Regulationselemente wie eine TATA-Box, eine CCAAT-Box und eine AP-1-Bindungsstelle (Drouin *et al.* 1985; Therrien und Drouin 1991). Bei -171 bis -160 bp befindet sich ein CRH-responsives Element (Jin *et al.* 1994). CRH stimuliert neben der Transkription von c-fos, FosB und JunB auch die Bindung an das AP-1-Element im POMC-Promotor (Autelitano und Cohen 1996). Das nGRE befindet sich an Position -77 bis -51. Man geht davon aus, dass GR dieses Element möglicherweise als Trimer bindet, welches durch Bindung eines Homodimers und anschließende Bindung eines Monomers auf der gegenüberliegenden Seite der DNA-Helix gebildet wird (Drouin *et al.* 1993).

Die Region zwischen -480 und -320 ist ebenfalls essenziell für die Repression des POMC-Promotors durch GCs. Möglicherweise entsteht eine hohe basale Transkription durch Interaktion von Faktoren die sowohl diese Region als auch den Bereich des nGREs binden. Die Aktivierung des GR könnte diese Interaktion zerstören und damit zur Repression des POMC Promotors führen (Riegel *et al.* 1991). Da überlappend zum nGRE zusätzlich ein Bindungselement für den Orphan-Transkriptionsfaktor Nur77 vorhanden ist, wird diese Region für eine hohe Basalexpression des Promotors benötigt (Riegel *et al.* 1991; Philips *et al.* 1997a; Phi-

lips *et al.* 1997b). GCs induzieren die DNA-Bindung des GR und neutralisieren so die Transkriptionsaktivierung durch Kompetition um die beiden überlappenden Bindungselemente (Philips *et al.* 1997b).

In GR^{dim/dim}-Mäusen konnte eine erhöhte Expression der POMC-mRNA nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die GC-vermittelte Repression des POMC-Promotors die DNA-Bindung des GR benötigt (Cis-Repression). Wie durch die erhöhte Menge von POMC-mRNA zu erwarten war, stiegen die ACTH-Level im Hypophysenvorderlappen an. Trotzdem blieb der ACTH-Spiegel im Blutserum unverändert. Daher geht man davon aus, dass die Sekretion von ACTH durch zusätzliche Mechanismen, die nicht von der GR-DNA-Bindung abhängig sind, reguliert wird (Reichardt *et al.* 1998).

1.7.2. Der Prolactin- Promotor

Prolaktin ist ein Peptidhormon welches die Milchproduktion reguliert, Zellproliferation auslöst und zusammen mit verschiedenen Zytokinen eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt (Subramaniam *et al.* 1998). Es wird in erster Linie in den lactotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet. Prolaktin bindet an die extrazelluläre Domäne des Prolaktin-Rezeptors, induziert dessen Dimerisierung und aktiviert seine Zielgene über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Groner und Shemanko 2002). Der Prolaktin-Promotor des Rindes wird durch ein nGRE zwischen -247 und -214 reprimiert (Sakai *et al.* 1988).

In Reportergentests konnte gezeigt werden, dass Dexamethason alle die Promotorkonstrukte reprimiert, die mindestens 310 bp 5'-flankierende Sequenz enthalten. Durch Einfügen eines positiven GEs in der Nähe des Transkriptionsstarts konnte der Promotor aktiviert werden, dh. Die GRE oder nGRE DNA-Sequenz bestimmt, ob die Bindung des GR an das jeweilige Element zu einer positiven oder negativen Regulation des Promotors führt.

Zusätzlich zum GR binden Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1) und Oct-1 (octamer-binding transcription factor 1) das nGRE-Bindungselement (gezeigt in GH3 Hypophysenzellen der Ratte) (Subramaniam *et al.* 1997). In GH3-Zellen kann das hPRL-Gen nur in der Gegenwart von Pit-1 und GR reprimiert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass GR und Pit-1 *in vitro* co-präzipitieren (Subramaniam *et al.* 1998). In GR^{dim/dim}-Mäusen konnte eine erhöhte Expression der Prolaktin-mRNA beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt einen DNA-bindungsabhängigen Mechanismus des GR (Reichardt *et al.* 1998). In Zellen, die nicht aus der Hypophyse stammen, werden die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Pbx (pre-B-cell leukemia transcription factor-1) sowohl für die volle transkriptionale Aktivität, als auch für die Repression durch Glucocorticoide benötigt (Nalda *et al.* 1997).

1.7.3. Der Proliferin-Promotor

Proliferin (PLF) ist ein Peptidhormon der Angiogenese, welches von der Plazenta produziert wird und sich sowohl in der mütterlichen, als auch in der fötalen Blutzirkulation verteilt (Toft *et al.* 2001 und enthaltene Referenzen). Des Weiteren wird Proliferin in der Haut exprimiert. Proliferin ist mit dem bereits vorgestellten Peptidhormon Prolaktin verwandt. Einige immortalisierte Zelllinien produzieren ebenfalls Proliferin. Deshalb nimmt man an, dass die PLF-Expression zum Tumorwachstum und zur Metastasierung beiträgt, da beide Prozesse von der Angiogenese abhängig sind (Toft *et al.* 2001). Phorbolester wie TPA (12-O-Tetradecanoyl-13-Phorbolacetat) induzieren die Proliferin-Expression über die Transkriptionsfaktoren c-jun oder c-fos (Mordacq und Linzer 1989; Diamond *et al.* 1990). Der Glucocorticoid-Rezeptor moduliert die Promotoraktivität, indem er an ein Komposit-Element (cGRE) bindet. Dieses cGRE enthält eine AP-1-Bindungsstelle, welche mit einem GR-Bindungs-element überlappt (Mordacq und Linzer 1989; Diamond *et al.* 1990). Ob der Promotor über dieses cGRE reprimiert oder aktiviert wird, hängt von der Zusammensetzung des AP-1 Komplexes ab. Während der GR die Aktivität des Promotors in Anwesenheit eines c-Jun-Homodimers potenziert, wird der Promotor bei einem c-Jun/c-Fos-Heterodimer reprimiert (Abbildung 59, Seite 100). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Ergebnisse mit großen Mengen an rekombinanten Proteinen ermittelt wurden (Diamond *et al.* 1990). Variation der DNA-Sequenz ergab, dass Kombinationen eines GREs und eines AP-1-Elementes sich dann wie ein cGRE verhalten, wenn dazwischen 14 bis 18 Basenpaare liegen. Bei mehr als 25 Basenpaaren aktiviert der GR den Promotor synergistisch mit AP-1 (Pearce *et al.* 1998).

1.7.4. Der CRH-Promotor

Die CRH (corticotropin releasing hormone)-produzierenden Neuronen des Hypothalamus integrieren unterschiedliche Signale wie den zirkadianen Rhythmus und die Stressreaktion (u.a. durch das negative Feedback der im Blut zirkulierenden Glucocorticoide). CRH ist ein Peptid von 41 Aminosäuren welches bei Stress eine wichtige Rolle spielt, da es die ACTH-Produktion des Hypophysenvorderlappens reguliert (King *et al.* 2002 und enthaltene Referenzen). In anderen Teilen des Gehirns wirkt CRH auch als Neurotransmitter (King *et al.* 2002). Der Promotor des CRH-Gens enthält ein cAMP-responsives Element (CRE) bei -224 bp und wird durch GCs negativ reguliert. Der humane CRH Promotor enthält ein nGRE in der Region von -278 bis -249 (Malkoski *et al.* 1997). Dieses nGRE enthält neben einer Bindungsstelle für GR eine weitere für den Transkriptionsfaktor AP-1. DNA-Mutationen, welche die Bindung von GR und AP-1 verhindern, führen zu einem Verlust der GC-abhängigen Repression (Malkoski und Dorin 1999). Im Gegensatz zu POMC ist der CRH-Spiegel in GR^{dim/dim}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Reichardt *et al.* 1998). Obwohl gezeigt werden konnte, dass GR direkt an die DNA des CRH-Promotors bindet, scheint der

Mechanismus der Repression in diesem Fall wegen der AP-1-Bindungsstelle unabhängig von der Dimerisierungsfunktion des Glucocorticoid-Rezeptors zu sein. Dieses negative Element wird als Komposit-Element klassifiziert (cGRE).

Obwohl der CRH-Promotor kein positives GRE enthält, haben Glucocorticoide ausserhalb des Hypophysenvorderlappens entweder keinen oder einen positiven Effekt auf die CRH-Produktion. Die gewebespezifische Repression des CRH-Promotors wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht. Die Aktivierung des CRH-Gens könnte durch indirekte Effekte zustande kommen, wobei Glucocorticoide möglicherweise die Expression eines positiv wirkenden Faktors induzieren (King *et al.* 2002).

1.7.5. Der Promotor des neuronalen Serotonin-Rezeptors

Der neuronale Serotonin (5-HT_{1A})-Rezeptor nimmt im Hippocampus eine Schlüsselrolle ein. Während der Knockout des entsprechenden Gens führt zu erhöhter Ängstlichkeit. Eine Adrenalectomie erhöht die mRNA-Level des 5-HT_{1A}-Rezeptors, da der Rezeptor im Hippocampus gewebespezifisch durch GCs reprimiert wird (Meijer *et al.* 2000). Das strukturell von den anderen Elementen abweichende nGRE befindet sich an Position -1169 bis -1148. Es besteht aus zwei Konsensus-Halbseiten, welche durch einen Abstand von 6 bp getrennt sind. Sowohl GR als auch der Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) werden für die Regulation dieses Genes benötigt (Ou *et al.* 2001 und enthaltene Referenzen). Die Repression ist dann am stärksten, wenn sowohl MR als auch GR gleichzeitig aktiviert werden. Der MR kann jedoch auch alleine zu einer Repression des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Spiegels führen. Dieses Element ist bisher das einzige nGRE, das ein MR/GR-Heterodimer bindet (Ou *et al.* 2001).

1.7.6. Der Promotor des VIP Typ I Rezeptors

Das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP) ist ein in weiten Bereichen exprimiertes Peptidhormon, welches in der Lunge als Muskelrelaxanz wirkt und Bronchodilatation und Vasodilatation induziert. Durch Inhibition von T-Lymphozyten und alveolaren Makrophagen wirkt VIP auch anti-inflammatorisch. Das Peptid übermittelt seine Wirkungen über zwei verschiedene Typen von Rezeptoren, VIP I und VIP II. Die beiden Rezeptoren zeigen ein abweichendes Expressionsmuster: Der Typ I Rezeptor wird vor allem in der Lunge, im Dünndarm, im Thymus, im cerebralen Kortex, im Hippokampus und in Brustkrebszelllinien exprimiert. GR supprimiert den Typ I VIP Rezeptor in Lungenzellen. Es konnte ein nGRE an Position -21 bis -36 im Promotor des Rezeptors charakterisiert werden (Pei 1996 und enthaltene Referenzen).

1.7.7. Der Gonadotropin-Promotor

Glucocorticoide reprimieren die Gonadotropin-Hormone und beeinträchtigen damit die Fortpflanzungsfähigkeit. Gonadotropine sind Glycoprotein-Hormone, welche aus einer gemein-

samen α -Untereinheit und verschiedenen β -Untereinheiten gebildet werden. Die α -Untereinheit findet sich im embryonalen Gonadotropin, im luteinisierenden Hormon (LH), im Follikel-stimulierenden Hormon (FSH) und im Thyroid-stimulierenden Hormon (Akerblom *et al.* 1988). Die humane α -Untereinheit wird in Plazenta, Hypophysenvorderlappen und in vielen Tumoren exprimiert (Arbiser *et al.* 1994). Die Repression durch Glucocorticoide ist gewebespezifisch (Akerblom *et al.* 1988):

In Reportergentests konnte gezeigt werden, dass GR den Gonadotropin-Promotor in Fibroblasten aktiviert, und in JEG-3-Karzinomzellen reprimiert (Chatterjee *et al.* 1991). GR bindet eine Region von 52 Nukleotiden, welche ein cAMP-responsives Element (CRE) enthält. In DNase Footprints waren drei geschützte Stellen sichtbar (Akerblom *et al.* 1988). Ein Fusionsprotein aus GR und β -Galactosidase, die den C-Terminus des GR ersetzte, bewirkte die Repression des endogenen GR (Oro *et al.* 1988). Dieses Ergebnis deutet auf einen gewebespezifischen Mechanismus hin, der möglicherweise sterische Hinderung beinhaltet.

1.7.8. Der GnRH Promotor

Das zentrale Steuerungshormon GnRH (gonadotropin releasing hormone) wird im Hypothalamus gebildet und regt die Bildung von Follikel-stimulierendem Hormon (FH) und luteinisierendem Hormon (LH) an. Für den GnRH-Promoter konnte mittels EMSA (electromobility shift assay) gezeigt werden, dass das GR-Bindungselement sowohl GR als auch Oct-1 (octamer-binding transcription factor 1) binden kann (Chandran *et al.* 1996; Chandran *et al.* 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GR an das Oct-1 Protein gebunden ist (Chandran *et al.* 1999). Dieser Mechanismus muss von der Definition her der Trans-Repression zugerechnet werden. Obwohl es sich hier also um kein nGRE handelt, wird doch die Ähnlichkeit zum Mechanismus der Repression des Prolaktin-Promotors deutlich: Hier binden Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1) und Oct-1 die nGRE-Sequenz zusätzlich zum Glucocorticoid-Rezeptor (Subramaniam *et al.* 1997). Möglicherweise werden die beiden Promotoren Prolaktin und GnRH nach einem ähnlichen Mechanismus reguliert. Es ist eine interessante Fragestellung, ob die Repression außer dem Vorhandensein der beiden Transkriptionsfaktoren GR und Oct-1 noch weitere Gemeinsamkeiten aufweist, die bisher noch nicht analysiert wurden.

1.8. Negative GREs und Immunmodulation

1.8.1. Apoptose

Apoptose, auch Programmierter Zelltod genannt, läuft in einer geordneten Reihenfolge morphologisch unterscheidbarer Phasen ab. Apoptose kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert werden, so z.B. durch UV- oder γ -Bestrahlung, dem Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika, sowie durch die Stimulation sogenannter Todesrezepto-

ren. Todesrezeptoren werden durch ihre natürlichen Liganden aktiviert. Mit einer Ausnahme sind alle Todesliganden Typ-II Transmembranproteine, von denen eine lösliche Form durch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen generiert werden kann.

Apoptose ist zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben notwendig. Alternde (senescente) und beschädigte Zellen werden so eliminiert. Sie spielt außerdem eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, insbesondere während der Entwicklung und im Immunsystem (Krammer 1999; Vaux und Korsmeyer 1999). Autoreaktive Zellen müssen beseitigt werden, um Autoimmunität zu verhindern. Am Ende einer Immunantwort wird die Zahl der aktivierten Lymphozyten reduziert, um die Immun-Homöostase zu erhalten (Baumann *et al.* 2002). Viele Krankheiten sind entweder mit erhöhter oder verminderter Apoptose assoziiert, so z.B. AIDS, Krebs und Autoimmunerkrankungen (Krammer 1999). Die wachsende Subfamilie der Todesrezeptoren gehört zu der TNF/NGF (tumor necrosis factor/nerve growth factor)-Rezeptor-Superfamilie. Todesrezeptoren sind differenziell glykosylierte Typ-I Transmembranproteine und zeichnen sich durch ihre intrazelluläre Todesdomäne (death domain, DD) aus, welche zur Transduktion des Todessignals notwendig ist. Beim Menschen sind sechs Mitglieder dieser Subfamilie bekannt, nämlich TNF-R1, CD95 (APO/Fas), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 und DR6 (Schulze-Osthoff *et al.* 1998; Ashkenazi und Dixit 1999). CD95 (Fas) ist der bisher am besten untersuchte Rezeptor (Krammer 1999; Schmitz *et al.* 2000).

1.8.2. Der FasL (CD95L)-Promotor und der Aktivierungs-induzierte Zelltod

Naive T-Lymphozyten werden durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) aktiviert, was eine spezifische Immunantwort auslöst. Im Gegensatz dazu wird in zuvor aktivierten T-Zellen auf dasselbe Signal Aktivierungs-induzierter Zelltod (activation induced cell death, AICD) ausgelöst (Klas *et al.* 1993; Radvanyi *et al.* 1993; Singer und Abbas 1994; Alderson *et al.* 1995; Brunner *et al.* 1995; Dhein *et al.* 1995; Ju *et al.* 1995; Nagata 1997). AICD ist ein wichtiger Mechanismus, um die Anzahl der reaktiven T-Zellen zu reduzieren und die Immunreaktion zu beenden (Freitas und Rocha 1999; Krammer 2000). Dies kann am Beispiel einer Infektion gezeigt werden: Wenn der Körper von der Infektion befreit ist, werden die während der Immunantwort generierten Effektorzellen überflüssig. Daher wird die große Mehrzahl der aktivierten T-Zellen am Ende der Immunreaktion durch AICD eliminiert. Dieser Prozeß kann auch als eine zweite Verteidigungslinie bei Autoimmunität wirken, indem durch ihn die autoreaktiven Zellen in der Peripherie zerstört werden. Die Sensitivität peripherer T-Zellen gegenüber AICD hängt von deren Aktivierungszustand ab. Die Entscheidung zwischen der proliferativen und der suizidalen Antwort der Zellen ist streng reguliert und beruht auf der Notwendigkeit zum Auslösen einer Immunreaktion oder zur Reduktion der aktivierten T-Zellen, die ihre Aufgabe erfüllt haben. Nur wenige Zellen überleben den AICD und differenzieren zu

Gedächtniszellen (Sprent und Miller 1976). Frisch aktivierte T-Zellen sind gegenüber Induktion von Apoptose über Stimulation des TCR resistent.

AICD wird hauptsächlich über den Signalweg des CD95 (oder auch APO-1/Fas) genannten Rezeptorsystems ausgelöst. CD95L (CD95 Ligand, CD178) wird durch die Vernetzung des TCR mit CD3 induziert und aktiviert den CD95-Signalweg. Die Stimulation von CD95 führt zur Bildung des hochmolekularen Proteinkomplexes DISC (death-inducing signaling complex), welcher wiederum die proteolytische Aktivierung der Procaspase 8 induziert (Abbildung 14). Die aktivierte Caspase 8 initiiert wiederum eine Reaktionskaskade, die schließlich über die Aktivierung anderer Caspasen zur Apoptose führt (Medema *et al.* 1997). Eine Fehlregulation der Expression von CD95L führt zu verschiedenen Erkrankungen wie Autoimmunität oder unkontrollierter Proliferation der Lymphozyten (Watanabe-Fukunaga *et al.* 1992; Takahashi *et al.* 1996). Der CD95L-Promotor ist komplex und umfaßt Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Es konnten beispielsweise Bindungsstellen für NF-AT (Latinis *et al.* 1997; Li-Weber *et al.* 1998; Nbrían *et al.* 1998), NF- κ B (Li-Weber *et al.* 2000) (Matsui *et al.* 1998; Kasibhatla *et al.* 1999), AP-1 (Matsui *et al.* 2000; Baumann *et al.* 2003), Egr (early growth response protein) (Mittelstadt und Ashwell 1998; Mittelstadt und Ashwell 1999) und IRF-1 (IFN-regulatory factor 1) (Chow *et al.* 2000; Kirchhoff *et al.* 2002) charakterisiert werden. Es ist bereits seit 1995 bekannt, dass Glucocorticoide und auch Retinsäure AICD durch Repression von FasLigand verhindern können (Yang *et al.* 1995; Cui *et al.* 1996). Während Dexamethason auf der einen Seite selbst Apoptose in T-Zellen induziert, verhindert es paradoxerweise den Aktivierungs-induzierten Zelltod AICD. Ob der Glucocorticoid-Rezeptor FasLigand über den Mechanismus der Cis- oder der Trans-repression reguliert, ist bisher noch nicht publiziert worden.

Beim Vergleich unterschiedlich differenzierter Zellen und verschiedener Zelllinien wurden im Hinblick auf die Signalübertragung nach CD95-Stimulation zwei Zelltypen identifiziert, CD95-Typ I und Typ II genannt (Scaffidi *et al.* 1998). Der Typ II-Signalweg ist von der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien abhängig, einem Prozess, der bei vielen Apoptose-Signalwegen wichtig ist (Kroemer 1997; Gross *et al.* 1999). In CD95-Typ I-Zellen ist die Induktion der Apoptose von der Aktivierung großer Mengen an Caspase-8 am DISC begleitet. Im Gegensatz dazu ist die DISC-Bildung in Typ II-Zellen trotz vergleichbarer CD95-Expression auf der Zelloberfläche schwach.

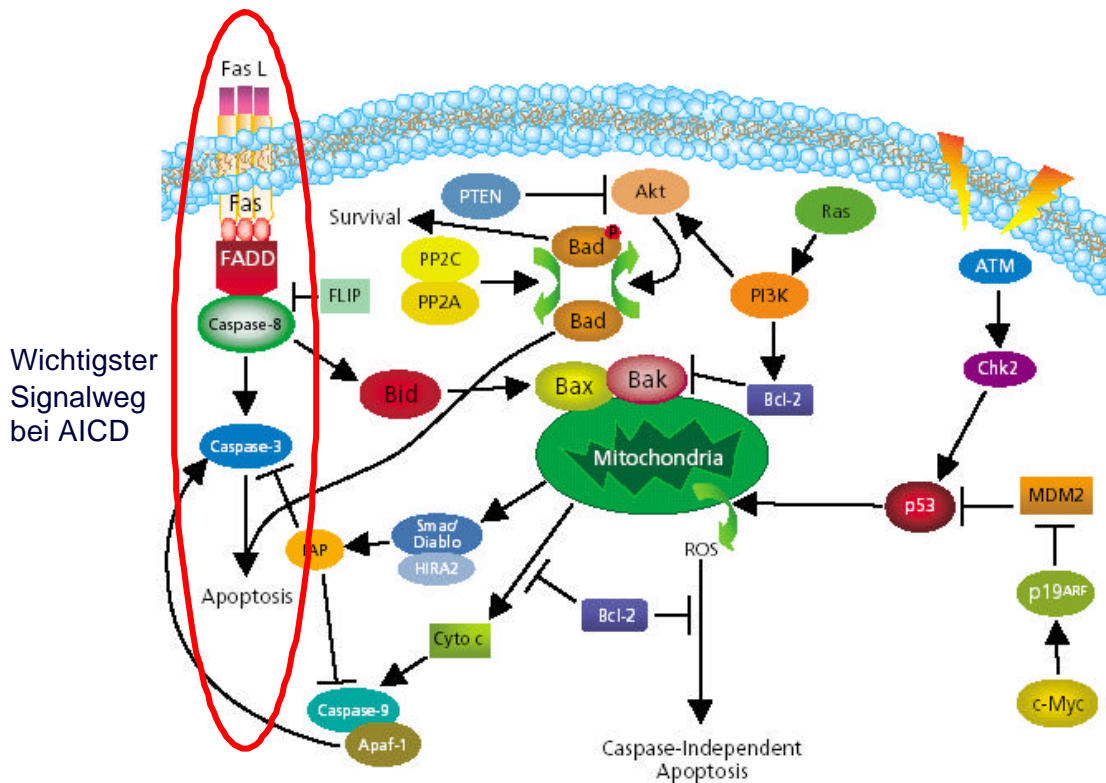


Abbildung 14: Die Rolle des FasLiganden beim Aktivierungs-induzierten Zelltod

Je nach Zelltyp und Auslöser kann die Apoptose auf verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden. Das Auslösen der Apoptose über die Aktivierung des Zellmembranrezeptors Fas (CD95) führt über den hochmolekularen Proteinkomplex DISC (death inducing signaling complex) zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10 und damit zur Apoptose. (Abbildung von Sigma-Aldrich)

CD95 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Die Expression des CD95-Liganden ist jedoch auf wenige Zellen beschränkt, wie z.B. aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Zellen sogenannter immunprivilegierter Gewebe und wird streng reguliert. Der CD95L ist für die außergewöhnliche Rolle der von der normalen Immunantwort ausgenommenen immunprivilegierten Gewebe wie Hirn, Ovar, Testis, Uterus während der Schwangerschaft, Plazenta und Auge verantwortlich (Barker und Billingham 1977). Da die Zellen dieser Gewebe CD95L exprimieren, werden in diese Bereiche einwandernde Immunzellen durch Apoptose beseitigt. CD95L-induzierte Apoptose spielt auch eine Rolle in einigen Autoimmunerkrankungen. Normale Thyrozyten exprimieren konstitutiv funktionellen CD95L, aber normalerweise kein CD95. In Hashimoto-Thyroiditis-Patienten exprimieren die Thyrozyten CD95, was die Induktion von Apoptose in diesen Zellen zur Folge hat (Giordano *et al.* 1997). Folglich führt bei Hashimoto-Thyroiditis die normalerweise schützende Funktion des CD95L bei Thyrozyten zur Zerstörung der Schilddrüse.

1.8.3. Der SOCS-3-Promotor

Proteine aus der Familie der SOCS-Proteine („suppressor of cytokine signaling“) können den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg inhibieren. Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg wird

von vielen gp130-stimulierenden Zytokinen wie z.B. IL-6, IL-11, LIF (leukemia inhibitory factor) oder auch von Leptin oder Prolaktin benutzt. Die Bindung des jeweiligen Liganden an den Zytokin-Rezeptor auf der Zelloberfläche führt zur Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung der Janus-Kinasen (JAK's). Anschließend wird die zytoplasmatische Domäne der Kinasen phosphoryliert, was wiederum zur Phosphorylierung der an den JAKs assoziierten Proteine, der STATs (signal transducers and activators of transcription) führt. Die Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes der STATs ermöglicht deren Homo- und Heterodimerisierung. Die dimerisierten STAT-Komplexe wandern in den Nukleus und aktivieren dort ihre Zielgene durch Bindung an spezifische Promotor-Bindungselemente (Imada und Leonard 2000). Die Familie der SOCS-Proteine enthält die Proteine CIS („cytokine inducible SH2 protein“) und SOCS-1 bis SOCS-7 (Auernhammer und Melmed 2001). Die Proteine SOCS-1 bis SOCS-3 und CIS werden durch Zytokin-Stimulation über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg induziert, und inhibieren sofort nach ihrer Induktion den JAK/STAT-Weg in einem klassischen negativen Rückkopplungsmechanismus (Kile und Alexander 2001; Larsen und Ropke 2002). In Immunopräzipitations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass SOCS-1 und SOCS-3 mit JAKs nach Zytokin-Stimulation präzipitieren und damit deren Kinasaktivität hemmen (Larsen und Ropke 2002). Man geht davon aus, dass die SOCS-Box eine Schlüsselfunktion als Mediator der bei SOCS-Proteinen wichtigen proteasomalen Degradation hat (Kile und Alexander 2001).

SOCS-3 gehört (zusammen mit SOCS-1) zu den am besten charakterisierten Proteinen dieser Familie. Obwohl die basalen Expressionslevel sehr niedrig bis nicht detektierbar sind, wird SOCS-3 neben LIF auch von anderen gp130-stimulierenden Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-11, Leptin, GH (growth hormone) und Prolaktin sehr schnell induziert (Marine *et al.* 1999; Auernhammer *et al.* 1999). Bei der Ratte konnte gezeigt werden, dass SOCS-3 durch Glucocorticoide reprimiert wird (Tollet-Egnell *et al.* 1999; Paul *et al.* 2000; Madiehe *et al.* 2001). Zu andern Spezies sowie zum Mechanismus der Repression liegen bisher noch keine publizierten Daten vor.

SOCS-3 ist in die Regulation der HPA-Achse (Auernhammer und Melmed 2001; Chesnokova *et al.* 2002) und in die Regulation der T-Zell-Differenzierung involviert (Kubo *et al.* 2003; Seki *et al.* 2003). Es wird in den Thymozyten der Maus selektiv in T_H2 -Zellen exprimiert. T_H2 -Zellen sind T-Helferzellen, welche im Gegensatz zu T_H1 -Zellen (aktivieren in erster Linie T-Zellen und Makrophagen) hauptsächlich B-Zellen aktivieren. Von Seki *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expression von SOCS-3 in den peripheren T-Zellen von Patienten mit Typ T_H2 -Erkrankungen wie atopisches Asthma und Dermatitis eng mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Seki *et al.* 2003). Je schwerer der Krankheitsverlauf, desto höher war die Expression von SOCS-3 in den T-Zellen. Man vermutet, dass SOCS-3 asthmatische Erkrankungen durch Inhibierung der über IL-12 vermittelten T-Zell-Entwicklung auslöst. Hierzu sind

jedoch noch keine Daten publiziert worden. SOCS-3 reguliert die Entwicklung der T-Zellen vermutlich auch über weitere Mechanismen wie die Inhibierung des IL-2, TCR und CD28-Signaltransduktionswege (Kubo *et al.* 2003).

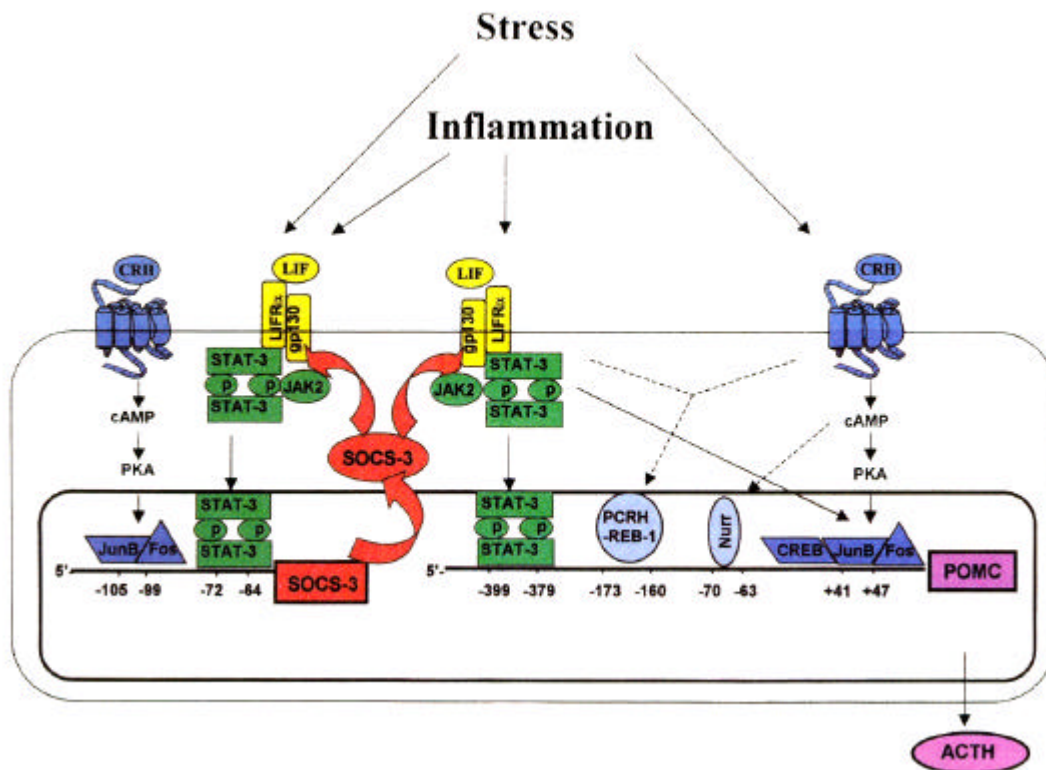


Abbildung 15: Regulation von SOCS-3 und POMC (Auernhammer und Melmed 2001)

SOCS-3 reguliert die POMC-Expression in corticotrophen Zellen. Sowohl SOCS-3 als auch POMC werden von CRH und LIF positiv reguliert. Das SOCS-3-Protein reprimiert den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg und verhindert damit die LIF-induzierte Promotoraktivierung des SOCS-3- als auch des POMC-Promotors. Da SOCS-3 durch die enthaltene SOCS-Box relativ schnell vom Proteasom degradiert wird ($t_{1/2} = 1,5$ h), ist dieser Effekt nur von kurzer Dauer.

SOCS-3 wirkt in corticotrophen Zellen ebenfalls als intrazellulärer Suppressor in der Zytokin-Signaltransduktion (Abbildung 15). Es inhibiert die STAT-abhängige POMC-Genexpression durch die negative Beeinflussung der LIF-induzierten Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges. Im Gegensatz dazu wird die CRH-induzierte POMC-Genexpression durch SOCS-3 nicht beeinflusst. LIF (leukemia inhibitory factor) ist ein potenter neuroimmunoendokriner Modulator. Die Stimulation corticotrophen Zellen mit LIF führt zu einer schnellen Hochregulation von SOCS-3 über einen STAT-abhängigen Mechanismus. Dadurch wird die LIF-induzierte Aktivierung des corticotrophen POMC-Gens limitiert, da die JAK/STAT-Aktivierung durch SOCS-3 gleich wieder blockiert wird. Auf der anderen Seite führt die damit ebenfalls reprimierte SOCS-3-Produktion und die schnelle proteosomale Degradation des SOCS-3-Proteins dazu, dass die Zelle ihren funktionellen Status schnell wiedererlangt. LIF und CRH induzieren den POMC-Promotor synergistisch. LIF aktiviert den

POMC -Promotor dabei nicht nur durch die STAT-Proteine, sondern auch indirekt durch die Induktion der STAT-abhängig exprimierten Transkriptionsfaktoren c-fos und JunB. CRH induziert auch den SOCS-3-Promotor durch Bindung von c-fos und JunB. Dadurch inhibiert CRH indirekt die LIF-induzierte Aktivierung des POMC-Promotors und reguliert den Crosstalk von CRH und LIF auf dem POMC-Promotor aktiv herunter.

1.8.4. Der Interleukin-1 β -Promotor

Das Zytokin Interleukin-1 β (Il-1 β) wird von Makrophagen, T und B-Lymphozyten, Fibroblasten, epidermalen Zellen und Endothelzellen als Reaktion auf andere Zytokine oder mikrobielle Produkte wie LPS (Lipopolysaccharid) gebildet (Zhang *et al.* 1997) und enthaltene Referenzen). Il-1 β ist ein wichtiger Entzündungsmediator welcher die Aktivierung von Leukozyten, verbindenden Gewebezellen und Gefäß-Endothelzellen beeinflusst (Zhang *et al.* 1997). Zhang *et al.* haben im Il-1 β Promotor ein nGRE an Position -570 bis -552 charakterisiert. Dieses 19bp-Element enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2. GR^{dim/dim}-Mäuse weisen eine erhöhte Expression von Il-1 auf (Grose *et al.* 2002). Daraus kann man schliessen, dass es sich hier höchstwahrscheinlich um einen DNA-bindungsabhängigen Mechanismus handelt.

1.9. Weitere negative GREs

1.9.1. Der Osteocalcin-Promotor

Glucocorticoid-induzierte Osteoporose (GIOP) ist eines der wichtigsten Probleme in der chronischen Therapie mit Glucocorticoiden. Auf der molekularen Ebene ist Osteoporose wegen ihrer Komplexität erst sehr unvollständig charakterisiert (Schäcke *et al.* 2002a; Väänänen und Härkönen 2002; Petrone *et al.* 2003).

Im Knochengewebe finden ständig Umbauprozesse statt, wobei die Osteoklasten den Knochen abbauen, und die Osteoblasten für die Bildung von neuem Knochen zuständig sind. Die Knochen dienen als Kalziumreservoir im Körper. Glucocorticoide supprimieren die Proliferation der Osteoblasten und verhindern damit die Knochenneubildung (Schäcke *et al.* 2002a; Väänänen und Härkönen 2002). Zusätzlich verringern GCs die gastrointestinale Kalziumaufnahme und erhöhen die Kalziumausscheidung (Schäcke *et al.* 2002a). Des weiteren regulieren Glucocorticoide die Transkription von einigen Matrixproteinen im Osteoblasten: Typ I Kollagen wird über Transrepression durch den GR reprimiert (Schäcke *et al.* 2002a; Väänänen und Härkönen 2002).

Osteocalcin (oder BGP, bone gla protein) ist nach den Kollagenen der Hauptproteinbestandteil der extrazellulären Knochenmatrix. Es wird von Vitamin D über ein VDRE (Vitamin D

Bindungselement) induziert und durch die Bindung des GR an ein nGRE, welches die TATA-Box überlappt, reprimiert (Stromstedt *et al.* 1991). Es konnte gezeigt werden, dass TBP (TATA box binding protein) und GR um ihre Bindungsstelle konkurrieren (Meyer *et al.* 1997b). Durch Mutation der nicht-kanonischen TATA-Box in eine Konsensus-TATA-Box mit stärkerer Bindungsaffinität gegenüber dem TBP-Protein konnte die GR-abhängige Repression reduziert werden (Meyer *et al.* 1997a).

1.9.2. Die Keratin-Promotoren

Keratine sind eine Familie von unterschiedlich exprimierten Proteinen der Epidermis. Die Expression der Keratine K5, K14, K6, K16 und K17 werden durch Glucocorticoide reprimiert. Radoja *et al.* haben in allen fünf Keratin-Promotoren nGREs identifiziert. Mittels DNase Footprint und Bandshift-Experimenten (EMSA) wurde gezeigt, dass GR diese Elemente üblicherweise als vier Monomere bindet (Radoja *et al.* 2000). Obwohl diese nGREs zwischen den verschiedenen Keratinen konserviert sind, weichen sie in ihrer Struktur deutlich von anderen charakterisierten nGREs ab.

1.9.3. Der α -Fetoprotein-Promotor

α -Fetoprotein (AFP) ist bei Säugetieren die Hauptkomponente im fötalen Serum. Das sekretorische Polypeptid ist dem Serum-Albumin in Struktur und Funktion sehr ähnlich und wird in Dottersack und Leber synthetisiert. AFP hat eine hohe Affinität für mehrfach ungesättigte Fettsäuren, bindet Östrogene und liefert seine gebundenen Liganden an die verschiedenen Gewebe. Die AFP-Serumspiegel fallen direkt nach der Geburt drastisch ab. Eine Erhöhung der AFP-Level beim Erwachsenen wird bei primären Leberkarzinomen, Teratokarzinomen und Darmkrebs beobachtet. Daher ist AFP ein wichtiger Tumormarker in der klinischen Praxis.

Der AFP Promotor der Ratte enthält eine repressives Element bei -169 bp und eine Enhancer-Region bei -2,5 kb, die beide durch Glucocorticoide reprimiert werden (Guertin *et al.* 1988; Poliard *et al.* 1990). Das nGRE befindet sich 180 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle bei allen analysierten Säugetierspezies (Nakabayashi *et al.* 2001). Neben dem nGRE befindet sich eine funktionelle AP-1 Bindungsstelle (Zhang *et al.* 1991).

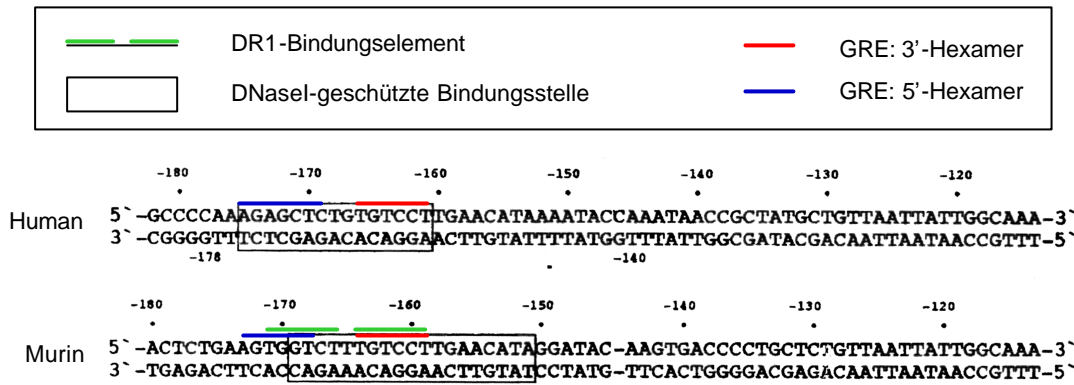


Abbildung 16: Strukturvergleich des humanen und murinen AFP-Promotors

Der humane und murine AFP-Promotor enthalten beide ein nGRE (rot und blau markiert). Zusätzlich zu dem nGRE enthält der murine Promotor ein DR1-Bindungsselement (grün markiert), dass für die beobachtete Spezies-spezifische Regulierung des Promotors verantwortlich gemacht wird. Der in Footprint-Experimenten vor der DNaseI geschützte Bereich wurde eingerahmt. Weitere Erklärungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach (Nakabayashi *et al.* 2001).

Während die 3'-Hexamere zwischen verschiedenen Säugetieren konserviert sind (wie bei anderen nGREs auch), zeigen die 5'-Hexamere Unterschiede, die vermutlich für die spezies-spezifische Regulation der AFP-Expression verantwortlich sind (Abbildung 16): Das humane 5'-Hexamer zeigt Ähnlichkeiten mit einem positiven GRE und wird positiv durch Glucocorticoide reguliert, und das Hexamer bei Nagern überlappt mit einem DR1-Bindungsselement, an das Nukleäre Rezeptoren wie PPAR, RXR oder der Orphan-Rezeptor HNF-4 binden können (Nakabayashi *et al.* 2001). Für die Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* liegen leider noch keine Daten vor.

2. Aufgabenstellung

Der Glucocorticoid-Rezeptor reprimiert seine Zielgene indem er entweder direkt an die DNA bindet (Cis-Mechanismus) oder durch DNA-unabhängige Bindung an positiv wirkende Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und NF- κ B (Trans-Mechanismus). Bisher ging man davon aus, dass die entzündungshemmenden Wirkungen der Glucocorticoide weitgehend über den Mechanismus der Trans-Repression reguliert werden, wohingegen die Nebenwirkungen vor allem durch DNA-abhängige Aktivierung und Repression (Cis-Aktivierung bzw. Cis-Repression) von Zielgenen vermittelt werden. Während die Cis-Aktivierung bereits umfangreich analysiert wurde, ist der Mechanismus der Cis-Repression nach wie vor unklar. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die DNA-bindungsabhängige Cis-Repression näher zu untersuchen und zu charakterisieren. Dabei ergeben sich zwei zentrale Fragestellungen:

- 1) Wie wird die Cis-Repression mechanistisch reguliert? Sind Korepressoren involviert und wenn ja, welche?
- 2) Gibt es zusätzlich zu den bereits charakterisierten nGRE-reprimierten Zielgenen weitere Zielgene für die Cis-Repression? Sind diese Gene möglicherweise in die Immunmodulation involviert?

Zur Klärung der 1. Frage soll ein *in vitro*-Bindungstest (ABCD, ABCDE) eingesetzt werden, um zum einen die Bindungsaffinität des GR zur DNA in Abhängigkeit vom Ligandenbindungsstatus des Rezeptors und der DNA-Sequenz zu untersuchen, und um zum anderen involvierte Kofaktoren mittels Western Blot und Massenspektrometrie zu identifizieren.

Zur Beantwortung der 2. Frage sollen die Promotoren der Gene FasLigand und SOCS-3 auf potenzielle nGREs hin untersucht werden. Die Relevanz dieser Gene hat sich aus Untersuchungen von S. Baumann (FasLigand) und W. Schmid (SOCS-3) ergeben. Dazu wird der oben beschriebene *in vitro*-Bindungstest in Verbindung mit Luciferase-Reportergentests eingesetzt. Die Verwendung verschiedener Mutanten des Glucocorticoid-Rezeptors soll Aufschlüsse hinsichtlich des Mechanismus der Repression dieser Zielgene durch Glucocorticoide geben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalie	Firma
Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis Grade)	LifeTech., USA
Albumin (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Antipain	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma, Steinheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)
DMEM (Dulbeccos minimal essential medium)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Marker (smart ladder)	Eurogentec, Köln
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim
ECL-Lösung 1 + 2	AmershamPharmacia
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories, Linz; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
FuGene	Roche, Mannheim
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe; Bio Whittaker Europe, Verviers (B)
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Agarose	Sigma, Steinheim

Heringsperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
HCl	Roth, Karlsruhe
H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
IPTG (Isopropylthio-beta-D-galactoside)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
[³⁵ S]Methionin (>1.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Fluka, Buchs (CH)
Milchpulver	Ja, Köln
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
NaOH (Natronlauge)	AppliChem, Darmstadt
Nukleotide	PeQlab, Erlangen; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Polyacrylamid (Lösung aus 30% Acrylamid /1% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
PBS (phosphate buffered saline, tissue culture grade)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe; Bio Whittaker Europe, Verviers (B)
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe; Bio Whittaker Europe, Verviers (B)
Pfx Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon 0,45 µM)	Millipore, Eschborn
Ponceaurot	Roth, Karlsruhe
Primer	ThermoHybAid, Ulm
Protein A-Agarose und Protein G-Agarose	Amersham, Freiburg
Protein-Marker	NEB, Frankfurt am Main, Bio-Rad, München
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor Mix (COMPLETE)	Roche, Mannheim
RPMI	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Taq Polymerase	Roche, Mannheim
TEMED (N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Thiamin	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Fluka, Buchs (CH)
Trypan-Blau	Sigma, Taufkirchen

Trypsin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trichostatin A (TSA)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe; Sigma, Taufkirchen
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma, Steinheim

Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) oder MBI bezogen. Weitere Grundchemikalien stammen von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg). Affinitätsmedien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Sigma oder Invitrogen (NV Leek, Niederlande) bezogen. Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Schleicher & Schuell (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA) geliefert. Zellkulturmedien, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur wurden von Serva bezogen, fötales Kälberserum von Biowhittaker (Verviers, Belgien).

Falls nicht anders vermerkt, wurden gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer aus dem Buch „Short protocols in Molecular biology“ (Ausubel *et. al.*, 1995) entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

3.1.2. Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

Ampicillin (Boehringer /Mannheim)	50 mg/ml in H ₂ O, steril filtriert (0.2 μ m), Aufbewahrung bei -20°C
Annealing Puffer	0,5 M NaCl 0,2 M Tris pH 7,4
Coomassie Entfärberlösung	200 ml Methanol 70 ml Eisessig in 1l H ₂ O
Coomassie Lösung (SDS-PAGE)	0.08% Coomassie G250 1.6% Phosphorsäure 8% Ammoniumsulfat 20 % Methanol
EDTA 0.5 M	pH 8.0 (pH: NaOH)
Hepes pH 7,8-7,9	Hepes 1M (Kaliumhydroxid) Steril filtrieren.
Heringssperma	20 μ g/ μ l

Immunpräzipitations-Waschpuffer	10 mM Tris pH 8 2 M NaCl 1 mM EDTA 10% Glycerol 0.05% NP-40 (Detergenz) 1mM DTT PIC (1:500)
Isopropanol-0,06N-HCl (MTT)	0,06M HCl in Isopropanol
LB agar (Difco/Detroit, USA)	LB-Medium 1% (w/v) Bacto-Agar
LB-Medium (Luria Broth) (Difco/Detroit, USA)	1% (w/v) Bactotrypton 0.5% (w/v) Hefeextrakt 172 mM NaCl pH 7.5
NaOH (5N)	200 g NaOH ad 1 l H ₂ O/DEPC-H ₂ O
NETN-Puffer (Zell-Lysepuffer)	10 mM Tris pH 8 2 M NaCl 1 mM EDTA 10% Glycerol 0.5% NP-40 (Detergenz) 1mM DTT 0.5mM PMSF 1 Tablette/10ml Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche, Mannheim) oder PIC (1:500)
Oligo Annealing Puffer	0,5 M NaCl 0,2 M Tris pH 7,4
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)	1 mg/ml Leupeptin 2 mg/ml Antipain 100 mg/ml Benzamidin 10.000 units/ml Aprotinin
PBS (phosphate buffered saline)	6.5 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 2.5 mM KCl 140 mM NaCl pH 7.25 (eingestellt mit HCl)

Puffer H 50 bzw. 100 mM KCl	20 mM Hepes pH 7,8-7,9 50 bzw. 100 mM KCl 20 %Glyzerin 1 mM DTT 0,1% NP40
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1M Tris-HCl pH 6.8
SDS-Lämmli-puffer (6 x)	3.5 ml 1M Tris/HCl pH 6.8 3 ml β -Mercaptoethanol (14,3M) 1 g SDS 3 ml Glycerol 200 μ l 1 % (w/v) Bromophenolblau ad 10 ml H ₂ O
SDS-Laufpuffer (10 x)	0.25 M Tris base (30,3g) 2.5 M Glycin (187,7g) 1% SDS (50ml 20% SDS) ad 1 l H ₂ O
SOC-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM MgSo ₄ 20 mM Glukose
TAE (Tris-Acetat-Ethanol) (50 x) (Agarose Gelelektrophorese)	242 g Tris-Base 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 57.1 ml HAc ad 1 l H ₂ O
TBE (Tris-Borat-EDTA) (10 x) (Agarose Gelelektrophorese)	108 g Tris-base 55 g Borsäure 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ad 1 l H ₂ O
TE (Tris-EDTA) (10 x)	100 mM Tris-HCl (pH 7.4, 7.5 oder 8) 10 mM EDTA pH 8 in steril filtriertem H ₂ O (DNA)/ DEPC-H ₂ O (RNA)
Transferpuffer (1 x) (für Westernblot)	200 ml 1xSDS-Laufpuffer 200 ml Ethanol (ad 1l H ₂ O)

Trenngelpuffer (SDS -PAGE)	1 M Tris-HCl pH 8.8
Zellkulturmedium	DMEM oder RPMI Medium 10% FCS 5% Glutamin 1% Pen/Strep

3.1.3. Plasmide

3.1.3.1. Eukaryontische Expressionsplasmide

Tabelle 4: Eukaryontische Expressionsplasmide

Name	Klonierungsvektor	Klonierungsstelle	Bezugsquelle
hGR	pcDNA3.1 /Hygro, Invitrogen	Xba und BamHI	Andy Cato, ITG Karlsruhe
A458T (hGR)	pcDNA3.1 /Hygro, Invitrogen	Xba und BamHI	Bernd Groner, GSH
4DX (hGR)	pcDNA3.1 /Hygro, Invitrogen	Xba und BamHI	Bernd Groner, GSH
SRC-1	pCMX-SRC-1	k. A.	Rosenfeld Labor, CA, USA

3.1.3.2. Eukaryontische Reportergenplasmide

Tabelle 5: Eukaryontische Reportergenplasmide

Name	Klonierungsvektor	Klonierungsstelle	Promotorbereich	Bezugsquelle
MMTV	pHH Luc, (Nordeen 1988)	(Nordeen 1988)	-326 bis +1	Olivier Kassel, ITG Karlsruhe
Col1	Col1 in pBL CAT3-Konstrukt, CAT3 durch Luc ersetzt	Hind III und BamHI (Schneikert <i>et al.</i> 1996)	-517 bis +63	Olivier Kassel, ITG Karlsruhe
hPOMC	pGL3-Basic, Promega	XhoI und HindIII	-613 bis +1	Anja Dostert, AG Heinzl
hAFP	pGL3-Basic, Promega	XhoI und HindIII	-685 bis +1	Anja Dostert, AG Heinzl
mAFP	pGL3-Basic, Promega	XhoI/HindIII	-544 bis +1	Anja Dostert, AG Heinzl

hFasL	pGL2-Basic, Promega	k.A. (Baumann <i>et al.</i> 2003)	-1204 bis +100	Sven Baumann, DKFZ
mSOCS-3 (clone 4)	pGL3-Basic, Promega	SstI und NheI	-2757 bis +106	Shlomo Mehmed, Cedars-Sinai Medical Center, USA
mSOCS-3 (clone 6)	pGL3-Basic, Promega	SstI und NheI	-2757 bis +929	Shlomo Mehmed, Cedars-Sinai Medical Center, USA
mSOCS-3 (clone 8)	pGL3-Basic, Promega	SstI und NheI	-273 bis +160	Shlomo Mehmed, Cedars-Sinai Medical Center, USA
mSOCS-3 (clone 6T1)	pGL3-Basic, Promega	SstI und NheI	-1862 bis +925	Shlomo Mehmed, Cedars-Sinai Medical Center, USA
mSOCS-3 (clone 6T2)	pGL3-Basic, Promega	SstI und NheI	-855 bis +925	Shlomo Mehmed, Cedars-Sinai Medical Center, USA

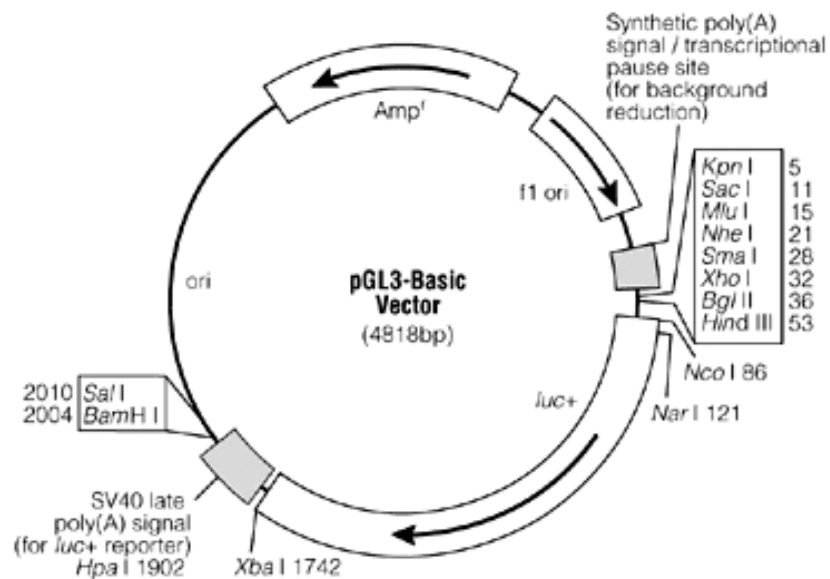


Abbildung 17: Vektorkarte des pGL3-Basic Vektors (Promega)

Das eukaryontischen Reportergenplasmid pGL3-Basic wurde zur Klonierung der Promotorkonstrukte hPOMC, mAFP und hAFP eingesetzt. Die Enzymschnittstellen und die Länge des Inserts sind in Tabelle 5 angegeben, die dazugehörigen Primer in Tabelle 9.

3.1.4. Antikörper

3.1.4.1. GR-Antikörper

Tabelle 6: GR-Antikörper

Name	Epitop	Spezies	Hersteller	Konzentration
GR M20	Aminoterminus	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:2000
GR P20	Carboxyterminus	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:1000
GR E20	Aminoterminus	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:2000
GR H300	as 121-420	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:2000
GR PA1-511	as 346-367	Kaninchen, polyklonal	Dianova	1:1000
GR PA1-512	as 245-259	Kaninchen, polyklonal	Dianova	1:1000
GR	as 245-259	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories	1:1000
GR	k.A.	Maus, monoklonal	Boehringer Ingelheim, Ridgefield	1:1000

3.1.4.2. Sonstige Antikörper

Tabelle 7: Sonstige Antikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller	Konzentration
N-CoR C-terminal, affinitätsgereinigt	Kaninchen, polyklonal	AG Heintel	1:2000
N-CoR (CoIP)	Meerschweinchen, polyklonal	Rosenfeld-Labor, USA	1:1000
RAR	Kaninchen, polyklonal	Rosenfeld-Labor, USA	1:500
HMG-1	Kaninchen, polyklonal	Pharmingen	1:1000
Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	Santa Cruz	1:10000
Ziege IgG, HRP-gekoppelt	Kaninchen, polyklonal	Sigma	1:5000
Maus IgG, HRP-gekoppelt	Schaf, polyklonal	Amersham Biosciences	1:10000

3.1.5. Enzyme

Die Restriktionsenzyme XhoI, HindIII, SmaI, SacI, Hpy188I und Bgl II wurden von den Firmen New England BioLabs (Schwalbach) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

Tabelle 8: Enzyme und Enzymkits

Name	Zweck	Referenz
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Gerichtete PCR Mutagenese	Stratagene
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	<i>in vitro</i> Transkriptions-Translations Reaktion; Proteinexpression	Promega
Platinum Pfx DNA Polymerase	PCR Reaktion	Invitrogen

3.1.6. Primer und Oligonukleotide

Tabelle 9: Primer für die PCR

Name	Sequenz (5'→3')
POMCfor	GCGCTCGAGCCTTGAGGCTTGGGGACACGGA
POMCrev	GCCAAGCTTGTCTTATATACTTGCCGAGCTC
AFP-M-for	GCGCTCGAGTTGTGCTCTAAGTTTTCTATGTTAAG
AFP-M-rev	GCGAAGCTTGGCAGTGCTGGAAGTGGGATGT
AFP-H-for	GCGCTCGAGTTGTGCTCTAAGTTTTCTATGTTAAG
AFP-H-rev	GGCAAGCTTGGCAGTGGTGGGAAGCACAATATG
MPrimerFor	GAGCTCAATGATGCTAGC
MPrimerRev	CGTAGGAAGCTTCTCGAG
FasLlongfor	GAGCTCAATGATGCTAGCGAGAGCAGCCATGGGACTAG
FasLlongrev	CGTAGGAAGCTTCTCGAGGACACAGGTGGTGGTGGAG
FasLshortfor	GAGCTCAATGATGCTAGCAGAGGAGGAAGGCTACATTTCC

FasLshortrev	CGTAGGAAGCTTCTCGAGAACATCAGCCAGCTGCAAC
FasL-113for	GAGCTCAATGATGCTAGCGTGGGTGTCTCACAGAGAAGC
FasL-765for	GAGCTCAATGATGCTAGCGAGTGGTCGGTTTTATAAAGGC
FasL-936for	GAGCTCAATGATGCTAGCTGGGAACCGAGACTGAGTTC
FasL-544rev	CGTAGGAAGCTTCTCGAGGGAAATGTAGCCTTCTCTCTCT

Tabelle 10: Biotinylierte DNA-Oligos

Name	Sequenz (5'→3')
TAT	AATCTCTGCTGTACAGGATGTTCTAGCTACT
TATmut	AATCTCTGCTGTAGAGGATCTTCTAGCTACT
MMTV	AGTTTATGGTTACAAACTGTTCTTAAAACG
hPOMC-D	GTGCTGCCGGGAAGGTCAAAGTCCCGCGCCGGGAAGGTCAAAGTCCCGCGCCAC
mPOMC-D	CGCTGCCAGGAAGGTACGTCCAAGGCTAGGAAGGTACGTCCAAGGCTCAC
POMC110	GCCCCGCGGCCCCCTTCCCCTGGCCCCGGGGAGCTGCTCCTTGTGCTGCCGGGAAGGC AAAGTCCCGCGCCACCAGGAGAGCTCGGCAAGTATATAAGGACAGAGGAG
AFP-D	GTATTTTATGTTCAAGGACACAGAGCTTATGTTCAAGGACACAGAGCTCTTTGG
DR5	AAGGGGATCCGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACTCGAGATCT
FASL 700 S mut	TGAATAATGATTTAGTATCTGCTGTGTGATG
FASL 500 S mut1	GGGGTTAGAGCAGCCTTCAACACCTGGCACACATTCCTG
FASL 500 S mut2	GGGGTTAGGGCAGCCTTGAAGACCTGGCATAACATTCCTG
FASL 500 S mut3	GGGGTTAGAGCAGCCTTTAATACCTGGCATAACATTCCTG
FASL 700 S	TGAATAATGTTTTAGTATGTGCTGTGTGATG
FASL 600 S	CCTCAGTTTTTCATCTGGTGACCAGAAGAGAG
FASL 500 S	GGGGTTAGGGCAGCCTTGAACACCTGGCACACATTCCTG
SOCS-3 752	CTCCCCAAAGGACATCAGCACCCACGTCTGT

SOCS-3 752mut	CTCCCCAAAGGAGATCAGCACTCACGTCTGT
SOCS-3 712	ACCAGGCAATGGGCGGATGAGCTGAGGCCAG
SOCS-3 712mut	ACCAGGCAAAGGGCGGATCAGCTGAGGCCAG
SOCS-3 518	CTTGGAAGTGTACATGAGGACCTCGGGGTGG
SOCS-3 518mut	CTTGGAAGTGTAGATGAGGACTTCGGGGTGG
SOCS-3 416	CTCCCGGCTGGCCTCCTAGAACTGCCCCG
SOCS-3 416mut	CTCCCGGCTAGCCTCCTACAAGTCCCCG
SOCS-3 4042	CTCCTAGAACTGCCCCGCGCTCCCATC
SOCS-3 404mut	CTCCTAGAAGTCCCCGCGTGCTCCCATC

3.1.7. Bakterien

Tabelle 11: Eingesetzte Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Hersteller
XL-1Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183(mcrCB-hsdSMR-mrr)173\ endA1\ supE44\ thi-1\ recA1\ gyrA96\ relA1\ lac\ [F'proAB\ lacIq\ \Delta 15M\ TZTn10(Telr)$	Stratagene
DH10B	F- $mcrA\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\phi 80d\ lacZ\Delta M15\ \Delta lacX74\ deoR\ recA\ endA1\ araD139\ \Delta(\ara,leu)7697\ galU\ galK\ \lambda\text{-}psL\ nupG$	Life Technologies

3.1.8. Zelllinien

Tabelle 12: Eingesetzte Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	Referenz
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie Zelllinie, die aus dem Blut eines 14jährigen Junges mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert wurde.	(Schneider <i>et al.</i> 1990)
HeLa	humanes Cervixkarzinom, wurde aus dem epitheliale Cervix einer 31jährigen Frau etabliert wurde.	(Scherer <i>et al.</i> 1953)
293T	Nierenzelllinie, aus primärem embryonalem Nierengewebe etabliert. Zellen sind mit dem E1A-Genprodukt transformiert und exprimieren das SV40 „large T“ Antigen.	(Graham <i>et al.</i> 1977)

MCF7	Humane Brustkrebszelllinie, etabliert aus einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Brustkrebs. Zellen sind positiv für die zytoplasmatische Lokalisation des Estrogenrezeptors	(Soule <i>et al.</i> 1973)
AtT20	Muriner Hypophysentumor, die Zellen produzieren ACTH (Adrenocorticotrophes Hormon)	(Ladman <i>et al.</i> 1953)
HepG2	Humane Hepatoblastomzellen eines 15-jährigen Argentiniers	(Knowles und Aden 1983)

3.2. Methoden

3.2.1. Klonierung

3.2.1.1. Kultivierung von E. Coli

Die plasmidhaltige Bakterien werden über Nacht bei 37°C und 220 rpm in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltigen Stämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 25% Glycerin.

3.2.1.2. Herstellung chemokompetenter Bakterien (XL-1 blue)

Lösung 1	100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KaAc, 10 mM CaCl ₂ , 13% Glycerol(v/v) pH 5,8; steril filtrieren
Lösung 2	10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 13 % Glycerin (v/v) pH 7,0; steril filtrieren

600 ml Bakterienkultur werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,48-0,5 angezogen und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 2000 rpm) geerntet. Die Zellen werden in 200 ml kalter Lösung 1 resuspendiert und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 15 ml Lösung 2 resuspendiert. Aliquots von 200 µl der Bakteriensuspension werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.3. Herstellung elektrokompetenter Bakterien (DH10B):

Eine Einzelkolonie der Bakterien wird über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen werden anschließend für 10-15 min auf Eis gekühlt und dann 20 min bei 5000 g und 2°C zentrifugiert. Die Zellen werden in 5 ml Eiswasser resuspendiert und 500 ml Eiswasser

wird hinzugegeben. Es erfolgt erneut eine Zentrifugation und die Zugabe von 5 ml Eiswasser, Resuspension und erneuter Zugabe von 500 ml Eiswasser. Die Zellen werden wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Die Zellen werden entweder gleich verwendet oder zur Lagerung mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80 C aufbewahrt.

3.2.1.4. Transformation in chemokompetente Bakterien

10 ng des zu amplifizierenden Plasmids wird zu den chemokompetenten Zellen (BI21 codon+) gegeben, welche auf Eis aufgetaut wurden. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zellen wird durch Kältestreß (30 min auf Eis) und anschließendem Hitzeschock (42°C für 60s) ermöglicht. Die Zellen werden anschließend kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 500 µl SOC-Medium 30 min bei 37°C vorkultiviert. Das Ansatzvolumen wird durch Zentrifugation halbiert, auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den angewachsenen Kolonien können dann zur Expression Flüssigkulturen inokuliert werden.

3.2.1.5. Transformation in elektrokompente Bakterien

Die Transformation in elektrokompente Zellen (DH10B) eignet sich besonders zur Amplifikation von niedrig konzentrierten Plasmidpräparationen, z.B. aus Ligationsansätzen. Die Elektroporations-Apparatur wird auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω eingestellt. Es wird 1 pg Vektor zu 50 µl eisgekühlten elektrokompenten Zellen gegeben und für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird dann in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben gepulst. Die Zellen werden in 700 µl SOC-Medium aufgenommen und 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert, in 80 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten ausplattiert.

3.2.1.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wird Plasmid-DNA mit dem NucleoleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert. Dabei wird nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)

Größere Mengen Plasmid-DNA werden aus 300 ml Kulturen mittels des Plasmid Maxi Kit der Firma Genomed präpariert. Dabei wird nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

3.2.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über deren Konzentration und Reinheit. Eine OD_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Ist der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} kleiner als 1,8, so deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

3.2.1.8. Ethanolfällung

20 μl	PCR-Product
80 μl	H_2O
10 μl	Natriumacetat (3M)
250 μl	EtOH (100%)

Die Lösungen werden zusammenpipettiert, gut gevortext und für 30 min bei 15000g zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen.

3.2.1.9. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten, zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen eingesetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zur Fragmentgröße, welche anhand eines DNA-Längenstandards abgeschätzt werden kann. Es werden in der Regel 1%ige TAE-Gele verwendet (Auftrennungsbereich 0,5-6 kb), die mit 0,002 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt werden, welches in die DNA interkaliert und so unter UV-Bestrahlung fluoresziert. Der Gellauf erfolgt in 1xTAE-Puffer bei einer kontinuierlichen Spannung von 10 mV/cm Gellänge. Anschließend werden die Fragmente unter UV-Licht (366nm) sichtbar gemacht und mit einem Videodokumentationssystem der Firma BioRad fotografiert.

3.2.1.10. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem gelelektrophoretischen Auftrennen der DNA-Fragmente wird die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

3.2.1.11. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen an für diese Nukleasen spezifischen Sequenzmotiven geschnitten werden. Dazu werden 1-10 Einheiten des jeweiligen Enzyms pro μg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (New England BioLabs/ MBI Fermentas) eingesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1-20 h bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur. Die Reaktion wird durch Zugabe von DNA-Ladepuffer abgestoppt.

3.2.1.12. Dephosphorylierung von 5'Enden

Um die Selbstligation von linearisierten Vektoren in nachfolgenden Klonierungen zu verhindern, werden im Anschluss an den Restriktionsverdau 1-2 Einheiten Alkalische Phosphatase (New England BioLabs) pro μg DNA zugeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Alkalische Phosphatase entfernt 5'-Phosphatgruppen, so daß eine Ligation nur noch mit dem Insert erfolgen kann, was die Ligationseffizienz erheblich erhöht.

3.2.1.13. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation kommt es zur Verknüpfung zweier DNA-Enden. Die Reaktion wird durch DNA-Ligasen katalysiert, wobei Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet werden. 0,5-1 μl geschnittener Vektor und Insert werden mit der SMART DNA-Leiter auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Konzentrationen pro μl berechnet. Die einzusetzende Insertmenge bei vorgegebener Vektormenge wird nach folgender Formel berechnet

$$\text{Insert}[\text{ng}] = \frac{\text{Vektor}[\text{ng}] \cdot \text{Insertgröße}[\text{kb}]}{\text{Vektorgröße}[\text{kb}]} \cdot \text{molares Verhältnis Insert/Vektor}$$

Der Ligationsansatz bestehend aus 10–50 ng Vektor-DNA, der berechneten Menge an Insert-DNA, Ligasepuffer und 400 U (Einheiten) der T4-DNA-Ligase wird in einem Volumen von 20 μl angesetzt. Die Reaktion erfolgt bei 22°C für 1 bis 2 Stunden. Um die Qualität des Vektors in der nachfolgenden Transformation abschätzen zu können, wird als Kontrolle eine Ligation ohne Insert durchgeführt. 2 μl des Ligationsansatzes werden anschließend für die Transformation von E.coli eingesetzt.

3.2.1.14. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung wird vom hausinternen Sequenzierservice mit einem ABI377 Sequenzierungsgerät durchgeführt. Die Sequenzen werden mit Hilfe der BLAST-Software analysiert, welche vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) zur Verfügung gestellt wird (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>).

3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) läßt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen zur Verfügung stellen. Im ersten Schritt hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer) mit der hitzedenaturierten einzelsträngigen DNA zu einem doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche dann im zweiten Schritt doppelsträngige DNA aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisiert.

Durch Hitzeeinwirkung trennen sich die komplementären Einzelstränge im dritten Schritt und können schließlich erneut mit den Primern hybridisieren, so dass sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Verwendet wurde die PCR zur Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte zwecks Klonierung und zur Herstellung biotinylierter PCR-Produkte für den ABCD-Bindungstest.

Spezifische DNA-Segmente werden mit einer Biometra T-Gradient PCR-Maschine amplifiziert. Die Reaktion wird in einem 50 µl Ansatz bestehend aus DNA-Template, DNA-Polymerase-Puffer, je 10 pmol der entsprechenden Primer (3' und 5'-Primer), 40 pmol des dNTP-Mix und 2 U DNA-Polymerase durchgeführt.

Es wurde folgendes Programm eingesetzt:

Zyklen	Ablauf der Reaktion	Zeit	Temperatur
	Start	5 min	94°C
30 Zyklen	Denaturierung	30 s	94°C
	Annealing	1 min	60°C (je nach Primern)
	Elongation	2 min	68°C (Pfx-Polymerase)
	Termination	10 min	68°C (Pfx-Polymerase)

Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgt für 30 s bei 94°C, während für die Hybridisierung der Primer für 30 s eine Temperatur ca. 5°C unterhalb des T_m-Wertes gewählt wird. Die Polymerasereaktion wird bei 72°C (Taq-Polymerase) oder 68°C (Pfx-Polymerase) mit einer Minute pro Kilobasenpaar des amplifizierten Produktes durchgeführt. Es erfolgten 30-35 Zyklen, die durch eine abschließende 10-minütige Synthesephase bei 72°C (Taq) bzw 68°C (Pfx) abgeschlossen werden. Die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder Jet Sorb Extraction Kit aus dem Gel eluiert.

3.2.3. PCR mit biotinylierten Primern

Für die PCR können auch 5'-biotinylierte Primer eingesetzt werden. Durch die 5'-Biotinylierung können die entstandenen PCR-Produkte nach Aufreinigung im ABCD-Bindungstest eingesetzt werden. Um Fragmente mit gleichen Restriktionsstellen herzustellen, kann eine zweistufige PCR-Reaktion durchgeführt werden. Die erste PCR wird mit Pri-

mern durchgeführt, die einen Überhang mit den entsprechenden Restriktionsstellen haben, in der zweiten PCR werden biotinylierte Primer eingesetzt, um die Fragmente anschließend im ABCD-Bindungstest einzusetzen (Abbildung 18).

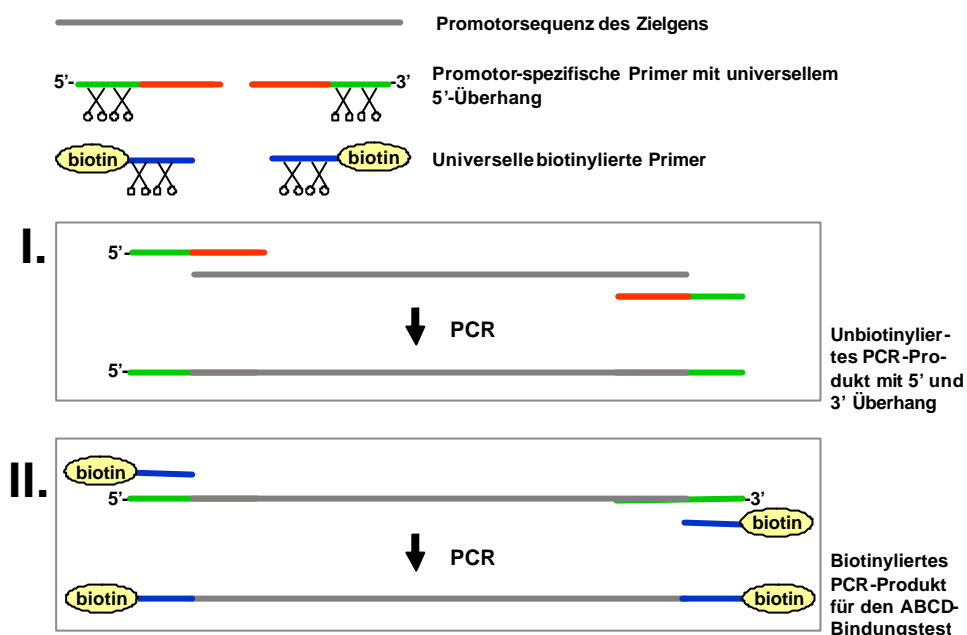


Abbildung 18 PCR mit biotinylierten Primern

Um die hergestellten PCR-Produkte sowohl im ABCD-Bindungstest als auch für die Klonierung einsetzen zu können, wurde eine zweistufige PCR durchgeführt. Im Ersten Amplifizierungs-Schritt wurde ein PCR-Produkt mit je einem 5'- und einem 3'-Überhang hergestellt. Dieser Überhang enthält Schnittstellen für Restriktionsenzyme. In einem zweiten Amplifikations-Schritt wurden universelle biotinylierte Primer eingesetzt, um so ein biotinyliertes PCR-Produkt für den ABCD-Bindungstest einzusetzen.

Während die 2. PCR-Reaktion unter Standardbedingungen durchgeführt wird (vgl. vorheriges Kapitel), wurde für die 1. PCR-Reaktion mit Überhang-Primern folgendes PCR-Programm eingesetzt:

Zyklen	Ablauf der Reaktion	Zeit	Temperatur
	Start	5 min	94°C
5 Zyklen	Denaturierung	30 s	94°C
	Annealing	1min	56°C
	Elongation	2 min	68°C (Pfx Polymerase)
30 Zyklen	Denaturierung	30 s	94°C

	Annealing	1min	72°C
	Elongation	2 min	68°C (Pfx Polymerase)
	Termination	10 min	68°C (Pfx Polymerase)

3.2.4. Herstellung von Proteinlysaten

3.2.4.1. Gesamtzellextrakte aus Zelllinien

Bei der Herstellung von Proteinlysaten werden alle Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt, um die Degradation von Proteinen zu minimieren. Zunächst werden die Zellen mit einem Zellschaaber von den Platten abgelöst. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (1.500 rpm, 10 Minuten, 4°C), das Medium abgenommen, die Zellen in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml NETN-Puffer (mit 1 mM DTT, PIC (1:500), 1 mM PMSF) pro 15 cm-Platte resuspendiert. Die Zellyse erfolgt während einer 15-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 Minuten, 4°C) und die Extrakte bei -80°C gelagert.

3.2.4.2. Extrakte aus Geweben der Maus

Das Mausgewebe (Gehirn oder Leber) wird aus dem -80°C-Gefrierschrank entnommen, gewogen und sofort mit eiskaltem NETN-Puffer in den Homogenisierer (Potter) gefüllt. Pro 1g Gewebe werden 5 ml NETN-Puffer (mit 1 mM DTT, PIC (1:500), 1 mM PMSF) eingesetzt. Das Gewebe wird mit circa 20 Pumpbewegungen homogenisiert, wobei sich möglichst keine Luftblasen bilden sollen. Das Homogenisat wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 15000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.3. Extrakte transduzierten SF9-Zellen

Zur Herstellung von rekombinantem Glucocorticoid-Rezeptor wurde ein Zellextrakt aus baculovirus-infizierten SF9-Zellen hergestellt. Neben GR exprimieren diese Zellen Hsp90, Hsp70 und p23, um korrekte Faltung und Konformation sicher zu stellen. Die Extrakte wurden von S. Goldrick und C.K. Shih (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, USA) hergestellt und auf Trokaneis geschickt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.4.4. TNT Translation

Für die zellfreie *in vitro* Translation wird das 'TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System' von Promega (Heidelberg) verwendet. Es enthält sämtliche benötigten zellulären Kom-

ponenten, die für die Proteintranslation benötigt werden. Transkription und Translation werden gleichzeitig ausgeführt. Um das gewünschte Protein zu exprimieren, muss die kodierende cDNA ein funktionelles Startkodon enthalten. Die cDNA ist in dem *in vitro*-Translationsvektor pcDNA3.1 kloniert. Das Plasmid wird in Bakterien amplifiziert die vorher durch Elektroporation transformiert wurden. Für eine 25 µl-Reaktion werden 1 µg Template-DNA in RNase-freiem Wasser mit 12,5 µl Kaninchen Retikulozytenlysat, 1 µl TNT Reaktionspuffer, 0,5 µl T7 RNA-Polymerase (10 U/µl), 0,5 µl Rnasin-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Aminosäure-Mischung (ohne Methionin) und 2 µl ³⁵S-Methionin (10 µCi/µl, Spezifische Aktivität >1000 Ci/mmol) für 90 min bei 30°C inkubiert. 1/10 der Proteinprobe wird für 3 Minuten bei 95°C mit Lämmli-puffer gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wird in einer Gel-trocknungslösung für 30 Minuten geschüttelt und auf 3MM Whatmanpapier in einem Gelvakuumtrockner für 45 min bis 1 h bei 80°C getrocknet. Ein Röntgenfilm wird in einer Filmkassette über Nacht auf das getrocknete Gel gelegt.

3.2.4.5. Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der kolorimetrischen Konzentrationsbestimmung nach Bradford wird eine Standardkurve mit definierten Proteinmengen erstellt, um anhand der Absorption der bekannten Proteinmengen unbekannte Proteinkonzentrationen zu ermitteln. Dieses Verfahren beruht auf dem Farbumschlag der Substanz Coomassie Blue G-250 von rot-braun ($\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$) zu blau ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$) durch in der Lösung enthaltene Proteine. Der negativ geladene Farbstoff bindet dabei an die positiv geladenen Arginin- und Lysinreste der Proteine.

Die Stammlösung des Proteinfärbereagens (Bio Rad Protein Assay, mit Coomassie G-250, BioRad, München) wird mit destilliertem Wasser 1 : 5 verdünnt. 1-2 µl des Proteinlysats werden mit 200 µl der Bradfordlösung in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und bei 595 nm vermessen. Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Eichreihe wird mit 0-10 µg BSA (Rinderserumalbumin in NETN) durchgeführt. Da der gebildete Protein-Farbstoff-Komplex mit der Zeit präzipitiert, wird die Absorption innerhalb von 30 Minuten ermittelt.

3.2.5. Immunopräzipitation (IP)

Bei der Immunopräzipitation kann ein spezifisches Protein aus einem Ganzzelllysat präzipitiert werden. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über den FC-Teil an Protein A oder Protein G bindet. Protein A/G ist über eine Sepharose-Matrix immobilisiert, so dass das Immunopräzipitat durch Zentrifugation der Protein A/G-Matrix gewonnen werden kann. Zum Zellextrakt wird 1µg des spezifischen Antikörpers gegeben und für 1-3 h auf Eis inkubiert. Es folgt die Zugabe von 50 µl der Protein-A/G Sepharose-Beads (1:1-Gemisch mit NETN-Puffer) und eine erneute Inkubation für 30-60 min

bei 4 °C auf einem Drehrad. Die Matrix wird dreimal mit NETN-Puffer (0,25% NP-40, Proteaseinhibitoren) gewaschen und dabei jeweils für 30 sec bei 2.000 rpm zentrifugiert. Das gebundene Protein wird durch Aufkochen der Sepharose-Beads mit Lämmli-Puffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Es wurden 300- 500 µg Gesamtprotein eines Zellysates und zusätzlich 200 µg eines Zellysates aus Baculovirus-infizierten SF-9 Zellen (Seite 54) für die IP eingesetzt.

3.2.6. Der ABCD-Bindungstest

Der ABCD-Bindungstest (**A**vidin **B**iotin **C**omplex **D**NA) wird eingesetzt, um die Bindungsaffinität eines Transkriptionsfaktors zu seinem DNA-Element zu ermitteln. Hierzu wird ein biotinyliertes DNA-Bindungselement mit der Bindungssequenz für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor mit einer Proteinquelle für diesen Faktor (und eventuell zu präzipitierende Kofaktoren) inkubiert (Abbildung 20). Der entstehende Protein-DNA-Komplex wird auf einer Streptavidinagarose-Matrix immobilisiert und mehrmals in Puffer H (50mM KCl) gewaschen. (Zum Prinzip der Biotin-Avidin-Bindung vgl. Abbildung 19) Das gebundene Protein wird durch Aufkochen der Streptavidin-Sepharose-Matrix mit SDS-Probenpuffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

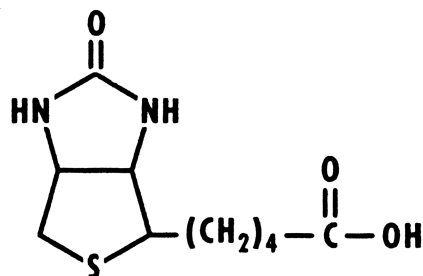


Abbildung 19: Strukturformel von Biotin (Vitamin H)

Biotin oder auch Vitamin H ist ein natürliches Vitamin, welches in jeder lebenden Zelle vorkommt. Avidin ist ein tetrameres Glycoprotein, das ursprünglich aus dem Hühnereiklar isoliert wurde. Das native Tetramer hat 4 Bindungsstellen für Biotin. Streptavidin ist ebenfalls ein tetrameres Protein, welches von *Streptomyces avidinii* isoliert wurde. Die Bindung von Avidin bzw. Streptavidin an Biotin ist die stärkste bekannte nicht-kovalente Interaktion zwischen einem Protein und seinem Ligand ($K_d=10^{-15}$ M). Die Bindung bildet sich sehr schnell aus und ist in einem sehr weiten Temperaturbereich, in einem extremen pH-Bereich und auch unter denaturierenden Bedingungen sehr stabil (Meier und Fahrenholz 1996). Deshalb wird die Avidin-Biotin-Bindung in der biochemischen Forschung vielfältig eingesetzt. Im Falle des ABCD-Bindungstests werden 5'-biotinylierte DNA-Oligos eingesetzt, welche anschließend mit Streptavidin-Sepharose immobilisiert werden.

Um die biotinylierten Einzelstrang-Oligonukleotide zu dimerisieren (annealing), werden 50 µg des ‚sense‘-Oligo und 50 µg ‚antisense‘-Oligo zusammen mit 10 µl 10 x Annealing-Puffer zusammenpipettiert und der Ansatz wird mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wird ein Becherglas mit Wasser zum Kochen gebracht, in eine Styroporkiste gestellt und das Reaktionsgefäß so bei 95°C inkubiert. Der Deckel der Styroporkiste wird ge-

geschlossen, damit der Reaktionsansatz langsam abkühlt. Nach der Abkühlung auf circa 30 bis 40°C werden die Proben bei 4°C oder bei -20°C aufbewahrt.

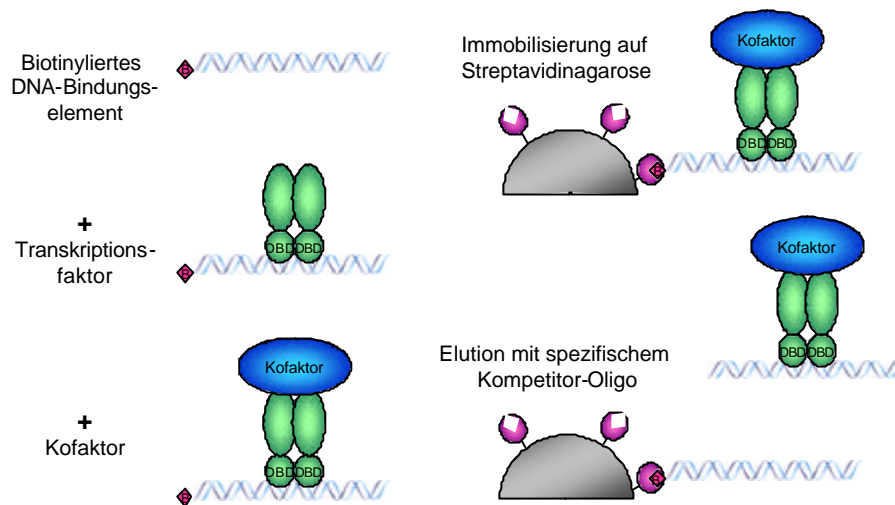


Abbildung 20: Der ABCD-Bindungstest

Der ABCD-Bindungstest wird eingesetzt, um die Bindungsaffinität zwischen der zu analysierenden DNA-Sequenz und dem Glucocorticoid-Rezeptor (oder einem anderen Transkriptionsfaktor) zu überprüfen. Dazu wird ein 5'-biotinyliertes GR-Bindungselement zusammen mit dem GR inkubiert. Die entstehenden Komplexe werden durch Streptavidin-Sepharose immobilisiert, mittels SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die ABCDE-Proteinaufreinigung wird ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt durchgeführt (Elution): Um die unspezifische Proteinbindung möglichst zu reduzieren, wird der GR mit einem 10-fachen Überschuss nicht-biotinyliertem DNA-Oligo von der Sepharosematrix eluiert und anschließend im Silbergel analysiert.

Zum Blocken und Equilibrieren der Streptavidin-Agarose wird die Streptavidin-Agarose suspendiert, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Equilibrieren wird zweimal mit je 800 µl Puffer H (50 mM KCl) gewaschen. Zum Blocken mit BSA wird die Streptavidin-Agarose mit Puffer H (enthält 2% BSA) auf 500 µl aufgefüllt und vor dem Einsetzen im ABCD-Bindungstest nochmals zweimal mit Puffer H ohne BSA gewaschen. Für den eigentlichen ABCD-Bindungstest wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

GR-Quelle	rekombinant	Murin	Ganzzellextrakt
Zellextrakt	40 µl	80 µl	200 µl (4µg/µl Protein)
Biotinylierte DNA	2 µl Oligo (1 µg/µl) oder 2µg biotinyliertes PCR-Produkt (Kapitel 3.2.3)		
H-DNA (Kompetitor)	10 µl (20 µg/µl)		

Dexamethason/RU486	2 μl (10^{-4}M)	2 μl (10^{-4}M)	5 μl (10^{-4}M)
Puffer H (100 mM KCl)	auf 200 μl auffüllen		auf 500 μl auffüllen

Die Proben werden für 5 min bei 30 °C im Thermomixer inkubiert, um die Ligandenbindung sicherzustellen und den GR zu aktivieren. Anschließend werden die Proben für 1 h bei auf Eis gestellt. Dann werden 50 μl der equilibrierten und blockierten Streptavidin-Agarose zugeben und die Reaktionsgefäße bei 4°C für 30 Minuten im auf einem Drehrad inkubieren gelassen. Die Streptavidin-Matrix wird dann 4 mal mit je 1 ml Puffer H (50 mM KCl) waschen. Die an die DNA gebundenen Proteine werden mit SDS-Probenpuffer nach Lämmli durch 5-minütiges Kochen bei 95°C eluiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.2.7. Die ABCDE-Proteinaufreinigung

Um den ABCD-Bindungstest zur Proteinaufreinigung einzusetzen, bedarf es eines weiteren Elutionsschrittes (ABCDE), um die unspezifisch an die Sepharose-Matrix gebundenen Proteine zu reduzieren. Dazu wird der DNA-gebundene Transkriptionsfaktor durch Kompetition mit der 10-fachen Menge an nicht-biotinyliertem DNA-Oligo (im Fall von GR wird das MMTV-Oligo eingesetzt) von der Matrix eluiert. Es werden 20 μg MMTV-Oligo in 25 μl Puffer H auf einem Thermomixer für 30 Minuten bei 15°C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wird der Überstand abgenommen, mit 5 μl 6-fach SDS-Probenpuffer nach Lämmli für 5 Minuten aufgeköcht und auf ein SDS-Gel geladen.

3.2.8. Der partielle Proteaseverdau

Der partielle Proteaseverdau gibt in Verbindung mit dem ABCD-Bindungstest Auskunft über DNA-Sequenz-bedingte Konformationsunterschiede. Man kann eine Konformationsänderung durch einen tryptischen Verdau nachweisen. Wenn man ein Protein mit der Protease Trypsin inkubiert, so wird dieses komplett verdaut. Trypsin gehört zusammen mit Chymotrypsin zu den Serin-Proteinasen, bei welchen sich Histidin und Serin im katalytischen Zentrum befinden. Trypsin spaltet Proteine an den spezifischen Schnittstellen Lysin-X und X-Arginin, während Chymotrypsin bei Leucin-X, Phenylalanin-X und Tyrosin-X spaltet. Bei einer sehr kurzen Verdau-Zeit entstehen für das Protein spezifische Fragmente, da das Enzym zuerst an den am besten zugänglichen Stellen schneidet. Wenn ein Protein in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, sind jeweils unterschiedliche Erkennungsstellen der Protease bevorzugt an der Oberfläche exponiert, und damit entstehen die proteintypischen Fragmente zu einem anderen Zeitpunkt. Die entstehenden Bandenmuster beim partiellen Verdau erlauben somit einen Rückschluss auf die Konformation des Proteins.

Ein ABCD-Bindungstest (Kapitel 3.2.6) wird mit rekombinantem GR durchgeführt. Nach dem Waschen der Streptavidin-Sepharose werden die Proben mit 20µl Trypsin-haltiger Lösung (2µg/µl Trypsin in Puffer H, 100 mM KCl) für wenige Minuten bei 37°C auf einem Thermomixer inkubiert (Zeitverlauf). Nach Ablauf der Zeit werden die Proben sofort mit 20µl 2x SDS-Probenpuffer nach Lämmli versetzt und im Heizblock bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht. Anschließend werden die Proben auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot auf das Bandenmuster hin untersucht.

3.2.9. SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach Lämmli

SDS-Gel Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

Die SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfat-**P**olyacrylamid-**G**elelektrophorese) ist ein kontinuierliches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Die Proben werden für 5 min bei 95°C in 2 x SDS-Ladepuffer inkubiert und durch das SDS mit einer kontinuierlichen negativen Ladung versetzt. Die Denaturierung der Proteine durch SDS in Kombination mit der Reduktion der Disulfidbrücken mit Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) unterbindet Protein/Protein-Wechselwirkungen. Die verschiedenen Proteine unterscheiden sich so nur noch in ihrer Grösse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zur Kathode. Die elektrophoretische Trennung wird in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Diese trennen die SDS-Protein-Komplexe durch ihren Molekularsiebeffekt nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf. Im Gel polymerisieren Acrylamidmonomere und Quervernetzer aus Bisacrylamid durch die Bildung freier Sulfatradikale aus dem Katalysator der Reaktion, Ammoniumpersulfat. Diese Reaktion wird durch den Radikalstabilisator TEMED beschleunigt. Hier wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Puffern verwendet (Dower *et al.* 1988). Ein Sammelgel (Tris-Puffer pH 6,8; 3-5% Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Puffer pH 8,8; 5-20% Acrylamid). Im Sammelgel werden die Proteine auf gleicher Höhe fokussiert. Dies geschieht durch das Zusammenspiel der Glycinat- und Chloridionen aus dem Elektrodenlaufpuffer: Die langsameren Glycinationen bilden hinter den mobileren Chloridionen eine Front, an der sich die Feldstärke lokal erhöht. Dadurch erfährt die Glycinatfront eine Beschleunigung. Auf ihrem Weg zur Anode nimmt sie die SDS-Protein-Komplexe auf. Die dann folgende Separierung der Proteine ist um so besser, je länger das Trenngel ist. Der Gellauf erfolgt in Form von vertikalen Plattengelen mit 7 bis 15%igen Trenn- und 5%igen Sammelgelen in SDS-Laufpuffer. Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel.

3.2.9.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen

Die Gele werden in Minigelkammern von BioRad (0,75mm oder 1mm) mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen. Dabei wird zuerst das Trenngel und dann das Sammelgel eingefügt. Dazwischen wird gewartet, bis das mit Butanol überschichtete Trenngel erstarrt ist.

Die Proben werden in 2x SDS-Probenpuffer nach Lämmli für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerin lässt die Proteine in die Gelspuren einsinken und das Bromphenolblau markiert die Lauffront. Aufgetragen werden 30-50 µg Protein (NETN-Extrakte) oder das in der Immunopräzipitation oder im ABCD-Bindungstest präzipitierte Material.

Trenngel (Tris pH 8,8)	Prozent Acrylamid					Sammelgel (Tris pH 6,8)
	7%	8%	10%	12%	15%	
30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	3.5 ml	4 ml	5 ml	6 ml	6 ml	830 µl
1M Tris	5.6 ml	5.6 ml	5.6 ml	5.6 ml	5.6 ml	625 µl
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	25 µl
H ₂ O	5.74 ml	5.24 ml	4.24 ml	3.24 ml	3.24 ml	3.49 ml
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

3.2.10. Westernblot und Immunfärbung

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel werden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgt über Nacht in Transferpuffer bei 100 mA/Membran in einer BioRad-Blotkammer. Nach dem Blotten kann der Proteintransfer mit reversibler Ponceaurotfärbung überprüft werden. Dazu wird die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung (Sigma) gefärbt und durch Waschen mit PBS-Tween anschließend wieder entfärbt. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran werden in entfettetem Milchpulver (5% PBS-Tween) für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper in 2% Milch/PBS-Tween für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur bis über Nacht bei 4°C.

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wird die Membran 2 x 10 min in PBS-Tween gewaschen und dann bei Raumtemperatur 30min bis 1h mit dem Zweitantikörper (in 2% Milch/PBS-Tween) inkubiert. Der Zweitantikörper bindet an den FC-Teil des Erstantikörpers und ist an das Enzym Meeretichperoxidase gekoppelt. Nach der Inkubation wird die Membran 4 x 10 min in PBS-Tween gewaschen und für 1 min mit ECL-Lösung bedeckt. Auf der Membran oxidiert die Meeretichperoxidase das in der Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid, welches dann seinerseits Luminol oxidiert. Bei der Oxidation emittiert Luminol Photonen (Chemolumineszenz). In der ECL-Lösung enthaltenes Phenol verstärkt diese Lumineszenz um den Faktor 1000. Die Lichtreaktion wird auf einem Röntgenfilm festgehalten. Die Expositionsdauer wird entsprechend der Stärke des Signals zwischen einigen Sekunden und 30 min variiert.

3.2.11. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

3.2.11.1. Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie G250, 40% Ethanol, 10% Eisessig

Entfärbelösung: 25% Ethanol, 10 % Eisessig

Zur Sichtbarmachung aller im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wird das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler gefärbt. Diese Färbung detektiert Proteinmengen ab circa 200 ng/0,5 cm Bande. Überschüssiger Farbstoff wird durch mehrfaches Wechseln der Entfärbelösung aus dem Gel entfernt. Das Gel wird zur Dokumentation zwischen zwei Folien der Firma BioRad (Cellophane Support, BioRad) getrocknet.

3.2.11.2. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Kolloidalem Coomassie Blue

55 ml	H ₂ O
20 ml	Methanol
5 ml	Färbelösung B
20 ml	Färbelösung A

Die Lösungen werden gemäß den Herstellerangaben der Firma Invitrogen zusammenpipetiert, und das Gel wird für 3-12 Stunden darin geschüttelt. Entfärbung erfolgt durch Schütteln des Gels in destilliertem Wasser für mindestens 7 Stunden. Die Gele können bis zum Trocknen in Wasser aufbewahrt werden.

3.2.11.3. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Das Polyacrylamidgel wird in 50% Ethanol / 10% Essigsäure für 30 min vorfixiert. Die eigentliche Fixierung erfolgt in einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Lösung für 30 min. Anschließend wird das Gel in H₂O für mindestens 1h gewaschen. Es folgt ein Reduktionsschritt in 100 µM DTT,

ebenfalls für 30 min. Die eigentliche Färbung wird in 0,1% Silbernitrat (30 min) durchgeführt. Das Gel wird für ca. 5s gewaschen und sofort in der Entwicklerlösung (3% Natriumcarbonat, 0,01% Formaldehyd) entwickelt. Dieser Schritt wird bei 4°C durchgeführt, um die Reaktion zu verlangsamen und eine schwächere Hintergrundfärbung zu erreichen. Wenn die Banden in der gewünschten Stärke sichtbar sind, wird die Reaktion durch Zugabe einer 10%igen Essigsäurelösung gestoppt. Sobald sich keine neuen CO₂-Blasen mehr bilden, kann das Gel in Wasser gewaschen und anschließend zu Dokumentationszwecken getrocknet werden.

3.2.11.4. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (MS-kompatibel)

Die klassische Silberfärbung ist nicht geeignet, um die Proteinbanden anschließend mittels Massenspektrometrie zu sequenzieren, da die Proteine durch Glutaraldehyd miteinander vernetzt werden und somit nicht mehr identifizierbar sind. Deshalb wird für die Massenspektrometrie der Silberfärbungskit SilverQuest™ Silver Staining Kit' der Firma Invitrogen verwendet. Das Gel wird nach der Elektrophorese kurz mit extra-reinem Wasser (Roth) gewaschen und für 20 min in einer Fixierungslösung (10 ml Fixierungskonzentrat, 90 ml extra-reines Wasser) geschüttelt. Anschließend wird das Gel nacheinander in 30% Ethanol, einer Sensitivierungslösung (10 ml Sensitivierungskonzentrat, 30 ml Ethanol, 60 ml extra-reines Wasser) und wieder in 30% Ethanol für jeweils 10 min gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Wasser (10 min) wird das Gel 15 min mit der Silbernitrat-haltigen Färbelösung (1 ml Färbelösung, 99 ml extra-reines Wasser) inkubiert. Das Gel wird für 20-60 Sekunden mit Wasser abgespült und in die Entwicklerlösung (10 ml Entwicklerkonzentrat, 1 Tropfen Enhancer-Lösung, 90 ml extra-reines Wasser) gegeben. Wenn die Banden in der gewünschten Intensität entwickelt sind, wird die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Stopp-Lösung (Konzentrat) gestoppt. Nach 10 min wird das Gel wieder für 10 min in extra-reinem Wasser gewaschen. Die zu sequenzierenden Banden werden ausgeschnitten und zur weiteren Verarbeitung verschickt (Boehringer Ingelheim, Ridgefield). 5-10 ng Protein sind mit der Silberfärbung detektierbar.

3.2.12. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (**Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization -Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry**) wird zur Proteinsequenzierung und zur Bestimmung der Masse von Proteinen und Peptiden eingesetzt. Sie zeichnet sich besonders durch kurze Analysenzeiten, ihre hohe Empfindlichkeit und die Möglichkeit zur Automatisierung aus.

Die Bande aus dem gefärbten Gel wird ausgeschnitten und nach Herstellerangaben wieder entfärbt. Anschließend werden die Proteine aus dem Gel eluiert. Die Proteine bzw. durch tryptischen Verdau entstandenen Peptide werden mit der Matrixsubstanz gemischt und getrocknet. Die Matrix wird mit einem gepulstem UV-Laser beschossen. Daraufhin wird die

Schwingungsenergie auf die Biomoleküle übertragen, welche dann in die Gasphase übergehen. Durch Protonenübertragung von Matrixmolekülen auf die Proteine/Peptide entstehen Protein-/Peptidionen, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Durch Messung der Flugzeit der Ionen auf einer Driftstrecke kann man sich auf die Masse der erzeugten Protein-/Peptidionen schließen. Weiterhin kann durch Fragmentierung einzelner Peptidionen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptids abgeleitet werden. Die Massen der Peptide können mit zuvor bestimmter Proteinsequenz (z.B. aus cDNA) verglichen werden. Wenn Massen und weitere Daten (hier z.B. das Molekulargewicht, bei der 2D-Gelelektrophorese auch der isoelektrische Punkt) bekannt sind, können die Massen zur Identifikation des Proteins in den Datenbanken verwendet werden.

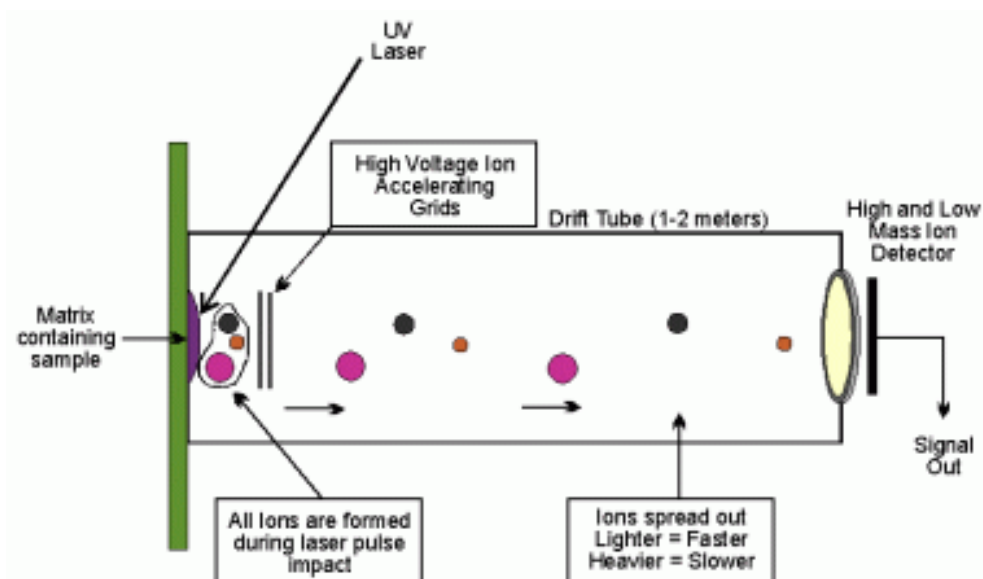


Abbildung 21 Schematische Darstellung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Protein- oder Peptidprobe, welche in einer Matrix immobilisiert ist, wird mit einem Laser beschossen. Die ionisierten Peptidfragmente werden beschleunigt und die Flugzeit (TOF, time of flight) der charakteristischen Proteinfragmente wird bestimmt. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Labor von Dr. Vladimir Papov (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, USA) durchgeführt. Bedingt durch die hohe Auflösung dieses Gerätes besteht eine der wichtigsten Schwierigkeiten darin, Keratinkontamination der Probe zu vermeiden. Deshalb wurde nur ein kleiner Teil der eluierten Probe mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und im Silbergel analysiert. Der größte Teil der jeweiligen Proben wurde auf Trockeneis nach Ridgefield geschickt, damit der Gellauf und die Weiterverarbeitung unter standardisierten Bedingungen ablaufen konnten. Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit kolloidalem Coomassie Blue gefärbt, wieder entfärbt, aus dem Gel eluiert und zur MS-Analyse vorbereitet.

3.2.13. Methoden der Zellkultur

Die verwendeten Säugerzelllinien werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, adhären Zelllinien zweimal wöchentlich mit Trypsin (5 min, 37°C) abgelöst, verdünnt wieder ausgesät. Dem Medium wird 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Langzeitaufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus 70% DMEM bzw. RPMI / 20% FCS / 10% DMSO.

3.2.13.1. Behandlung von Zellen

Tabelle 13: Substanzen zur Zellbehandlung: Stammlösungen und Konzentrationen

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Phorbolmyristolat (PMA)	100 µg/ml in Ethanol	100 µg/ml
Ionomycin	500 µg/ml in Ethanol	1 µg/ml
Dexamethason (Dex)	10 ⁻⁴ M in Ethanol	10 ⁻⁷ M
RU486 (RU)	10 ⁻⁴ M in Ethanol	10 ⁻⁷ M
Valproinsäure (VPA)	0,5 M in Zellkulturmedium	1,5 mM
Trichostatin A (TSA)	10 ⁻⁴ M in Ethanol	10 ⁻⁷ M

Kultivierte HepG2-Zellen werden mit einer Dichte von 75000 Zellen pro 12-Loch ausgesät. 24 Stunden später werden die Zellen transfiziert, nach weiteren 4 Stunden werden die entsprechenden Substanzen zu dem Kulturmedium zugegeben (vgl. Tabelle). VPA wird frisch in dem entsprechenden Medium angesetzt (0,5 M). TSA wird in Ethanol verdünnt (10⁻⁴ M aus 10⁻² M Stocklösung) und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.13.2. Transfektion mit FuGene

Die Transfektion mit FuGene wird nach Herstellerangaben in 12-Loch-Platten durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion werden 75000 Zellen/12-Loch-Platte ausgesät. Für die Durchführung der Transfektion werden pro 12-Loch 100µl FCS-freies Zellkulturmedium mit 1,5µl FuGene versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die zu transfizierende DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf die 12-Loch-Platte gegeben und vorsichtig geschwenkt. Für die Luciferase-Reportergentests wurden pro 12-Loch 0,3 µg Reporter-Plasmid, 0,3 µg GR-Plasmid, 0,1 µg GFP und 0,1 µg SV40 βGal eingesetzt.

3.2.13.3. Transfektion für den Luciferase-Reportergentest

Für einen Luciferase-Reportergentest werden 75000 HepG2-Zellen/Loch bzw. 150000 HeLa-Zellen/Loch in 12-Loch Platten ausgesät und entsprechend der Versuchsanordnung transfiziert und behandelt. Für den Harvest-Puffer werden 1,25 ml 1M MesTris (pH 7,8), 25µl 1M DTT, 250µl 10% Triton X100 und 2,5 ml Glycerin (10%) zusammen pipettiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 100 µl Harvest-Puffer geerntet. Die Extrakte werden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand wird für die Messung der Luciferase-Aktivität und für den β-Galaktosidasetest eingesetzt.

3.2.13.4. β-Galaktosidasetest

100x Mg	100 mM MgCl ₂ , 4,5 M β-Mercaptoethanol
ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	4 mg/ml ONPG in 100 mM NaPi pH 7,5
NaPi (Natriumphosphat-Puffer pH7,5)	41 ml 200 mM Na ₂ PO ₄ 9 ml 200 mM NaHPO ₄

Die Kotransfektion des SV40 β-Galactosidase-Vektors bei einer Transfektion ermöglicht die Durchführung eines β-Gal-Tests. Hierfür wird 1 µl 100x Mg Lösung, 22 µl ONPG (Substrat), 72 µl 100 mM NaPi pH 7,5 mit 10 µl Zellextrakt in eine 96-Loch-Platte pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 200 µl 1M Na₂CO₃ gestoppt und sofort danach bei einer OD von 420 nm in einem Photometer gemessen.

3.2.13.5. Messung der Luciferase-Aktivität

Luziferin	16,7 ml 5 mM KHPO ₄ , 5 mg Luziferin (Endkonzentration 3000µg/ml)
Luziferinpuffer	1,25 ml 1 M MesTris, 250 µl 1M MgCl ₂ , 24 mg ATP, 8,25 ml H ₂ O
Substratpuffer	Luziferin und Luziferinpuffer im Verhältnis 1:1

Die Zellen werden mit PBS gewaschen. In einer 96-Loch-Platte werden 10 µl Zellysat je Loch des Transfektionsansatzes pipettiert. Das Luminometer wird so programmiert, dass 50 µl Substratpuffer je Loch dazugeben wird. Nach Zugabe des Substratpuffers erfolgt nach 20 s die Messung. Die exprimierte Luciferase katalysiert nach Zugabe des Luziferinsubstrats eine Reaktion bei der Licht emittiert wird, welches durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert werden kann. Das emittierte Licht ist proportional zur Transaktivierungsaktivität des Faktors.

4. Ergebnisse

Der Glucocorticoid-Rezeptor reprimiert seine Zielgene sowohl indem er an DNA bindet (Cis-Mechanismus), als auch durch DNA-unabhängige Bindung an Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B (Trans-Mechanismus). In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-bindungsabhängige Cis-Repression untersucht und näher charakterisiert. Es wurde ein *in vitro*-Bindungstest (ABCD, ABCDE) eingesetzt, um zum einen die Bindungsaffinität des GR zur DNA in Abhängigkeit vom Ligandenbindungsstatus des Rezeptors und der DNA-Sequenz zu untersuchen, und zum anderen um involvierte Kofaktoren mittels Western Blot und Massenspektrometrie zu identifizieren. Des Weiteren wurden verschiedene Promotoren, welche durch Glucocorticoide reprimierbar sind, hinsichtlich des Repressionsmechanismus charakterisiert. Dazu wurden Reportergerätestests mit verschiedenen Mutanten des Glucocorticoid-Rezeptors durchgeführt.

4.1. Der ABCD-Bindungstest zur Analyse von GR-Bindungselementen

Der ABCD-Bindungstest (Avidin, Biotin, Complex, DNA) kann dazu eingesetzt werden, um DNA-Elemente auf ihre Bindungsaffinität zum Glucocorticoid-Rezeptor zu überprüfen. Biotinylierte DNA-Sequenzen können so miteinander verglichen werden (Abbildung 22).

In diesem Experiment wurden Gesamtzellextrakte der Maus aus den Organen Leber und Gehirn eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesen Geweben stark exprimiert (siehe Abbildung 13). Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die GRE-Sequenz des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT) und die nGRE-Sequenz des α -Fetoprotein-Promotors (AFP) eingesetzt. Wegen der schwächeren Bindungsaffinität der nGREs im Vergleich zu GREs werden Erstere als Dimere (AFP-D) eingesetzt, d.h. die Sequenz des nGRE wiederholt sich im Abstand von wenigen Basenpaaren. Als Negativkontrolle dient das TAT-Bindungselement, welches durch je eine Mutation in jeder Halbseite seine Bindungsaffinität zum Glucocorticoid-Rezeptor vollständig verloren hat. Abbildung 22 zeigt, wieviel Glucocorticoid-Rezeptor jeweils relativ zum Input (10 %) durch 2 μ g des entsprechenden DNA-Oligos präzipitiert werden konnte. Das TAT-Bindungselement zeigt die höchste Affinität zum GR. Da das nGRE des α -Fetoprotein-Promotors eine relativ große Ähnlichkeit mit einem positiven GRE aufweist (siehe Kapitel 1.9.3, Seite 34), hat es auch eine deutlich stärkere Bindungsaffinität zu GR als andere im Folgenden analysierte nGRE-Bindungselemente.

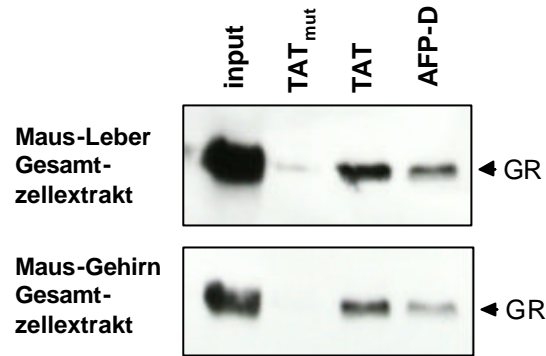


Abbildung 22: Der ABCD-Bindungstest mit verschiedenen Bindungselementen

Gesamtzellextrakte der Maus aus den Organen Leber und Gehirn wurden im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesen Geweben stark exprimiert (siehe Input, entspricht 10 % der im Experiment eingesetzten Extraktmenge). Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die GRE-Sequenz des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT), und die nGRE-Sequenz des α -Fetoprotein-Promotors (AFP) eingesetzt. Wegen der schwächeren Bindungsaffinität der nGREs im Vergleich zu GREs werden Erstere als Dimere (AFP-D) eingesetzt. Als Negativkontrolle dient ein mutiertes TAT-Bindungselement. GR wurde im Western Blot mit dem GRM20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

Abbildung 23 zeigt einen ABCD-Bindungstest unter Einbeziehung verschiedener DNA-Oligos des POMC-Bindungselementes. Hier wurde ein Gesamtzellextrakt aus der murinen AtT20-Zelllinie (Hypophysenvorderlappen) als Quelle für den Glucocorticoid-Rezeptor eingesetzt. Generell weisen die POMC-DNA-Oligos eine deutlich niedrigere Bindungsaffinität zu GR auf als das AFP-D-Oligo. Gerade die kurzen (30 bp) Monomer-Elemente (POMC1) zeigen keine Bindung, wohingegen die dimerisierten (50 bp) Bindungselemente (POMC2 und 3) eine deutliche Bande erkennen lassen. Wie in Kapitel 4.2 näher ausgeführt wird, weisen gerade bei nGREs die längeren DNA-Fragmente von 100 bis 600 bp eine deutlich höhere Bindungsaffinität auf.

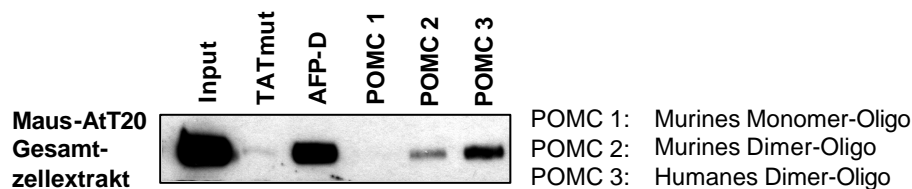


Abbildung 23: Der ABCD-Bindungstest mit POMC-Bindungselementen

Gesamtzellextrakte aus der murinen AtT20-Zelllinie wurden im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesen Geweben stark exprimiert (siehe Input, entspricht 10 % der im Experiment eingesetzten Extraktmenge). Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die nGRE-Sequenzen des α -Fetoprotein-Promotors (AFP) und verschiedene POMC-Sequenzen eingesetzt. Als Negativkontrolle dient das mutierte TAT-mut-Bindungselement. GR wurde im Western Blot mit dem GRM20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

4.2. Biotinylierte PCR-Produkte im ABCD-Bindungstest

Um ganze Promotoren oder längere Teilbereiche von Promotoren bezüglich ihrer GR-Bindungsaffinität zu untersuchen, ist es nicht praktikabel, alle potenziellen nGREs als kurze DNA-Oligos zu untersuchen. Darum wurde getestet, ob der ABCD-Bindungstest auch mit längeren DNA-Fragmenten durchführbar ist. Dazu wurde eine PCR-Reaktion mit biotinylierten Primern durchgeführt, das im Agarosegel aufgetrennte PCR-Produkt aus dem Gel eluiert und im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Als Quelle für GR wurden in diesem Experiment Gesamtzellextrakte der Maus aus den Organen Leber und Gehirn eingesetzt. Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die GRE-Sequenz des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT) und die nGRE-Sequenz der Promotoren α -Fetoprotein (AFP-D) und Pro-opiomelanocortin (POMC) eingesetzt. Das TATmut-Element diente als Negativkontrolle. Als biotinylierte PCR-Produkte wurden der humane und der murine AFP-Promotor (jeweils Fragmente von 600 bp Länge) eingesetzt. Die biotinylierten PCR-Fragmente binden GR mit vergleichbarer Intensität wie das AFP-D-Oligo. Dies ist um so interessanter, da das PCR-Produkt zwar in der gleichen Menge eingesetzt wurde, aufgrund seiner Länge jedoch über deutlich weniger Bindungsstellen für den Glucocorticoid-Rezeptor verfügt. Möglicherweise stabilisieren andere gebundene Faktoren die GR-DNA-Bindung. Das hier ebenfalls eingesetzte POMC-Oligo hat eine sehr niedrige Bindungsaffinität. Darauf wird im folgenden Experiment näher eingegangen.

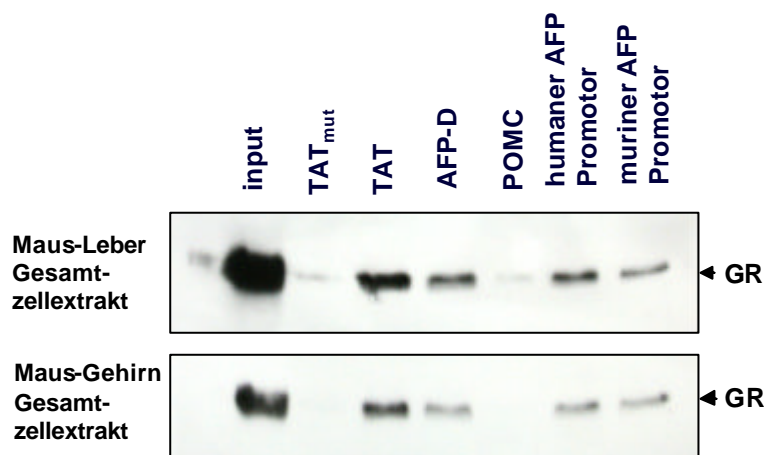


Abbildung 24: Der ABCD-Bindungstest mit verschiedenen DNA-Fragmenten

Gesamtzellextrakte der Maus aus den Organen Leber und Gehirn wurden im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesen Geweben stark exprimiert (siehe Input, entspricht 10 % der im Experiment eingesetzten Extraktmenge). Als Positivkontrollen wurden die GRE-Sequenz des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT) und die nGRE-Sequenz des α -Fetoprotein-Promotors (AFP-D) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das TATmut-Bindungs-element. Als biotinylierte PCR-Produkte wurden der humane und der murine AFP-Promotor (jeweils Fragmente von 600 bp Länge) eingesetzt. GR wurde im Western Blot mit dem GRM20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

Das Verfahren wurde ebenfalls am POMC-Promotor überprüft, welcher ein bereits charakterisiertes proximales nGRE enthält. Zur Kontrolle wurde das biotinylierte PCR-Produkt an den in Abbildung 25 gezeigten Positionen verdaut. Die so entstandene kürzeren Fragmente POMC Δ1 und POMC Δ2 wurden im Agarosegel aufgetrennt, eluiert und im ABCD-Bindungstest eingesetzt.

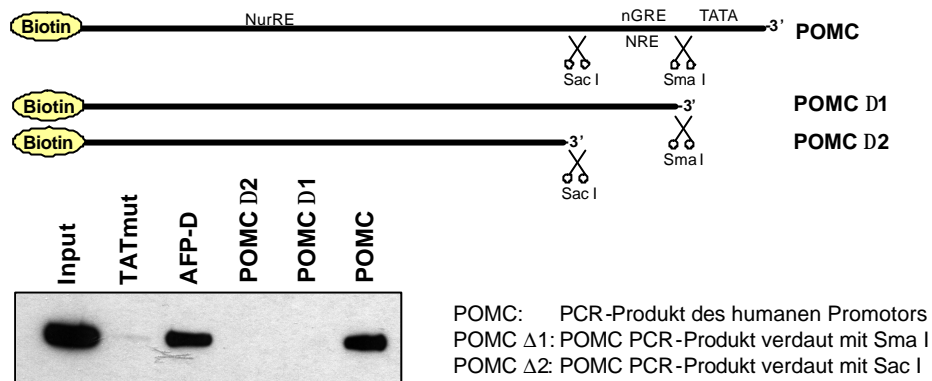


Abbildung 25: Analyse des POMC-Promotors mit bereits bekanntem nGRE

Gesamtzellextrakte aus der murinen AtT20-Zelllinie wurden im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesen Geweben stark exprimiert (siehe Input, entspricht 10 % der im Experiment eingesetzten Extraktmenge). Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die nGRE-Sequenzen des α -Fetoprotein-Promotors (AFP) und verschieden lange PCR-Produkte des POMC-Promotors eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das mutierte (TATmut)-Bindungselement. GR wurde im Western Blot mit dem GRM20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

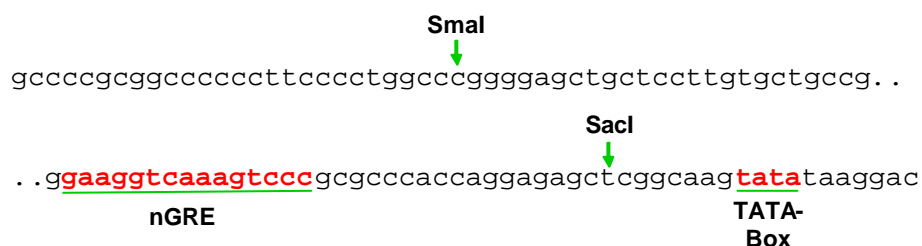


Abbildung 26: Die DNA-Sequenz des proximalen POMC-Promotors

Beim proximalen Promotor des humanen POMC-Gens liegen das nGRE und die TATA-Box relativ dicht beieinander. Die Abbildung zeigt die Stellen, an denen die PCR-Fragmente des Promotors verdaut wurden. Interessanterweise scheint der GR die Anwesenheit der TATA-Box zu benötigen um das nGRE binden zu können.

Es wurde ein Ganzzellextrakt der murinen AtT-20-Zelllinie eingesetzt. Das 600 bp lange DNA-Fragment des POMC-Promotors bindet GR mit vergleichbarer Affinität wie das AFP-D-Oligo von ca. 50 bp. Wie in Kapitel 4.1 erwähnt, benötigen nGREs offensichtlich flankierende

Sequenzen, um eine stabile Bindung des GR an die DNA zu ermöglichen. Das POMC Δ 2-Fragment, welches kein nGRE mehr enthält (vgl. auch Abbildung 26), ist auch nicht mehr in der Lage, GR zu binden. Interessanterweise weist das POMC Δ 1-Fragment, welches das nGRE noch enthält, keinerlei Bindungsaffinität mehr zum Glucocorticoid-Rezeptor auf. Möglicherweise stabilisiert sich die GR-Bindung durch Interaktion mit Proteinen, welche den Promotor im Bereich der TATA-Box binden.

4.3. Ligandeneffekt

Der Glucocorticoid-Rezeptor aktiviert und reprimiert seine Zielgene abhängig von der Bindung eines entsprechenden Agonisten oder Antagonisten an seine Ligandenbindungs-Domäne. Nur der ligandengebundene Rezeptor ist zur Translokation in den Zellkern in der Lage. In Experimenten mit konfokaler Mikroskopie wurde jedoch beobachtet, dass ein kleinerer Anteil des GR in Abwesenheit des Liganden im Zellkern lokalisiert zu sein scheint. *In vitro* können der Rezeptor, die Kofaktoren und die entsprechende DNA unabhängig vom Ligandenbindungsstatus miteinander interagieren. Es soll überprüft werden, ob die Bindung des Rezeptors an DNA und die Bindung von Kofaktoren im ABCD-Bindungstest ligandenabhängig ist oder nicht. Ein Ligandeneffekt ist auch für die Charakterisierung neuer GR-Agonisten mit verändertem Wirkungs-/Nebenwirkungsverhältnis von Interesse.

4.3.1. Ligandenabhängige Bindungsaffinität des GR zur DNA

In diesem Experiment (Abbildung 27) sollte überprüft werden, ob die Affinität des Glucocorticoid-Rezeptors zu seinem jeweiligen DNA-Element von der Konformation der Ligandenbindungs-Domäne beeinflusst wird. Für dieses Experiment ist es von großer Wichtigkeit, dass keine endogenen Liganden im Extrakt vorhanden sind. Als Quelle für den Glucocorticoid-Rezeptor dient hier ein Thymus-Gesamtzell-extrakt der Ratte.

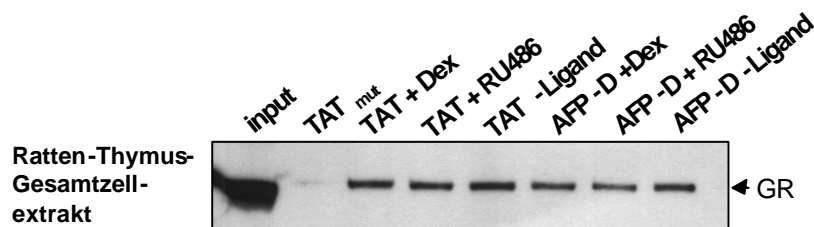


Abbildung 27: Überprüfung der ligandenabhängigen Bindungsaffinität des GR

Gesamtzell-extrakte aus dem Thymus der Ratte wurden im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird in diesem Gewebe stark exprimiert (siehe Input, entspricht 10 % der im Experiment eingesetzten Extraktmenge). Als biotinylierte DNA-Oligos wurden die GRE-Sequenz des TAT-Promotors und die nGRE-Sequenz des AFP-Promotors in Anwesenheit des Agonisten Dexamethason bzw. des Antagonisten RU 486 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das mutierte TAT^{mut}-Bindungselement. GR wurde im Western Blot mit dem GRE20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

Biotinylierte DNA-Oligos, welche die DNA-Sequenz des Tyrosin-Aminotransferase (TAT) Promotors und des α -Fetoprotein (AFP) Promotors enthalten, wurden in Gegenwart des Agonisten Dexamethason (Dex) bzw. des Antagonisten RU486 auf ihre Bindungsaffinität bezüglich des Glucocorticoid-Rezeptors überprüft. Als Negativkontrolle diente wieder das mutierte Element des TAT-GRE, TATmut. GR bindet seine jeweiligen DNA-Oligos mit gleicher Affinität sowohl in Gegenwart des Agonisten, als auch in Gegenwart des Antagonisten oder ohne Ligand. Dieses Experiment wurde sowohl mit rekombinantem GR sowie mit Zell-extrakten aus mit den jeweiligen Liganden vorbehandelten Zellkulturzellen durchgeführt.

Es wurden viele verschiedene Bedingungen bei diesen Experimenten variiert (Daten nicht gezeigt). So wurden die Menge und Art der Kompetitor-DNA (H-DNA oder poly dIdC; 1 μ g bis 10 μ g), die Salzkonzentration (KCl; 50mM bis 300mM) das Detergenz (NP40, CHAPS) und dessen Konzentration (für NP40 von 0,1 bis 0,3 %) und die BSA-Konzentration zum Blocken der Streptavidin-Sepharose-Matrix variiert. Auch wurden unterschiedliche Zellextrakte eingesetzt. GR bindet grundsätzlich an sein DNA-Element, solange die Salzkonzentration unter 250 mM liegt, nicht mehr als 0,3 % NP40 vorhanden sind und nicht mehr als 20 μ g Kompetitor-DNA eingesetzt werden (entspricht der 10-fachen Menge des biotinylierten DNA-Oligos).

Jedoch konnte in einigen Experimenten eine stärkere DNA-Bindung in Gegenwart des Agonisten beobachtet werden (TAT-Bindungselement, Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war unter den getesteten Bedingungen nicht reproduzierbar. Es konnte jedoch in keinem einzigen Experiment eine stärkere GR-Bindung in Abwesenheit des Liganden beobachtet werden. Möglicherweise hängt die hier dargestellte Beobachtung unter anderem von der Stabilität des GR-Hitzeschock-Komplexes ab, dem *in vitro* bei fehlender Kompartimentstruktur sicher eine größere Bedeutung zukommt als in der intakten Zelle.

4.3.2. Ligandenabhängige Bindungsaffinität von Kofaktoren zu GR

Nukleäre Rezeptoren aktivieren oder reprimieren ihre Zielgene in Abhängigkeit von anderen DNA-gebundenen Proteinen (bei GR z.B. benachbart gebundene Jun und Fos-Transkriptionsfaktoren) oder in Abhängigkeit der gebundenen Kofaktoren. In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob der an GR gebundene Ligand das Bindungsverhalten der Kofaktoren beeinflusst.

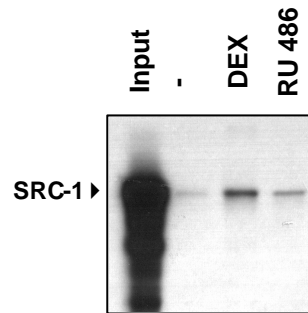


Abbildung 28: Co-Immünpräzipitation von GR und dem Koaktivator SRC-1 (NCoA2)

Ein Gewebezellextrakt aus dem Gehirn der Maus wurde in Gegenwart des GR-Agonisten Dexamethason, des GR-Antagonisten RU486 oder ohne Ligandenzugabe mit dem *in vitro* TNT-translatierten und mit ^{35}S markiertem Koaktivator SRC-1 inkubiert. GR wurde mit dem GRM20-Antikörper präzipitiert und mit Protein A/G-gekoppelter Streptavidin-Sepharose isoliert (Co-Immünpräzipitation). Das co-präzipitierte SRC-1 wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Ein Gewebezellextrakt aus dem Gehirn der Maus wurde in Gegenwart des GR-Agonisten Dexamethason, des GR-Antagonisten RU486 oder ohne Ligandenzugabe mit dem *in vitro* TNT-translatierten und mit ^{35}S -markiertem Koaktivator SRC-1 inkubiert (Abbildung 28). GR wurde mit dem GRM20-Antikörper präzipitiert. Das co-präzipitierte SRC-1 wurde mittels Autoradiographie detektiert. Der Glucocorticoid-Rezeptor interagiert mit dem Koaktivator SRC-1 in Anwesenheit des GR-Agonisten Dexamethason. Man erkennt eine leichte Bindung auch in Gegenwart des Antagonisten RU486, jedoch ist die Intensität dieser Bande eher mit der Negativkontrolle vergleichbar (-). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob GR auch mit dem Korepressor N-CoR interagiert.

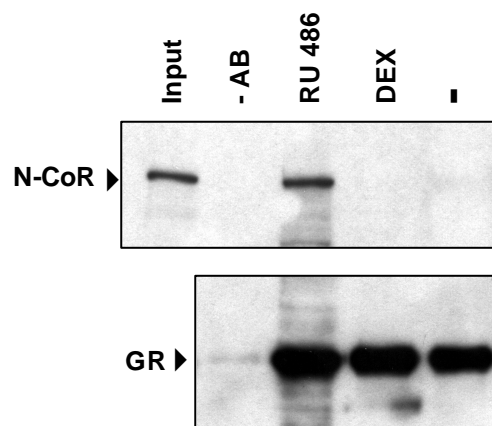


Abbildung 29: Co-Immünpräzipitation von GR und dem Korepressor N-CoR

Ein Gewebezellextrakt aus dem Gehirn der Maus wurde in Gegenwart von dem GR-Agonisten Dexamethason, dem GR-Antagonisten RU486 oder ohne Ligandenzugabe eingesetzt. GR wurde mit dem GRM20-Antikörper präzipitiert und mit Protein A/G-gekoppelter Streptavidin-Sepharose isoliert (Co-Immünpräzipitation). Der co-präzipitierte endogene Korepressor N-CoR wurde mittels Western Blot detektiert (N-terminaler N-CoR-Antikörper, AG Heinzel). GR wurde mit dem GRM20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert. Als Negativkontrolle dient eine Probe ohne GR-Antikörper (-AB). (Abbildung erweitert nach (Dostert und Heinzel 2002))

Ein Gewebezellextrakt aus dem Gehirn der Maus wurde in Gegenwart von dem GR-Agonisten Dexamethason, dem GR-Antagonisten RU486 oder ohne Ligandenzugabe eingesetzt (Abbildung 29). GR wurde mit dem GRM20-Antikörper präzipitiert. Der co-präzipitierte endogene Korepressor N-CoR wurde mittels Western Blot detektiert. In allen Proben, welche den GR-Antikörper enthielten, konnte GR auch im Western-Blot detektiert werden. Der Korepressor N-CoR konnte nur in Anwesenheit des GR-Antagonisten detektiert werden. Die Konformation des Glucocorticoid-Rezeptors in Gegenwart seines Antagonisten RU486 ermöglicht die Bindung von N-CoR, während der Rezeptor in Agonisten-Konformation nicht zur Interaktion mit dem Korepressor in der Lage ist.

Lefstin et al. (Lefstin und Yamamoto 1998) stellten die Hypothese auf, dass neben dem Liganden auch die DNA-Sequenz für die Konformation des Glucocorticoid-Rezeptors und damit auch für die Bindung von Kofaktoren eine Rolle spielt. In Kooperation mit der AG Eggert konnten wir zeigen, dass GR auch in der Zelle mit dem Korepressor N-CoR interagiert (Schulz *et al.* 2002). Im nächsten Experiment wurde überprüft, wie sich der Rezeptor verhält, wenn er an ein negatives GRE gebunden ist.

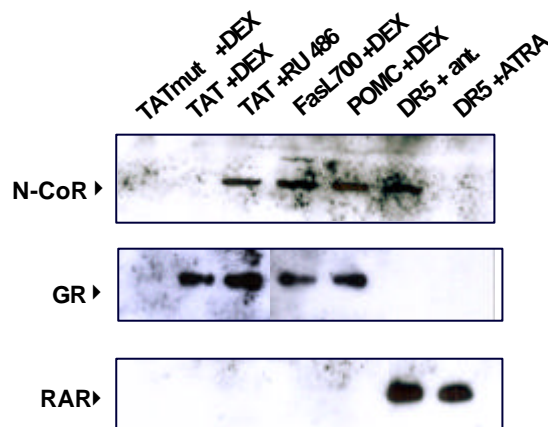


Abbildung 30: ABDC-Bindungstest mit GR und dem Korepressor N-CoR

Rekombinantes GR-Protein wurde mit einem Ganzzellextrakt aus der MCF-7-Zelllinie (Quelle für RAR, RXR und N-CoR) zusammen eingesetzt. Als biotinylierte DNA-Oligos wurden TAT, ein Element des FasLiganden-Promotors (FasL) und ein nGRE des Pro-opiomelanocortin-Promotors (POMC) eingesetzt. Das DR5-Bindungsselement (direct repeat 5) ist ein klassisches Bindungselement für das RAR/RXR-Heterodimer und wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das TATmut-Element eingesetzt. Als Agonist für GR wurde Dexamethason eingesetzt und als GR-Antagonist RU486. Für das RAR/RXR-Heterodimer wurde der Agonist All-trans-Retinsäure (ATRA) und eine Mischung verschiedener Antagonisten (ant. 109) eingesetzt (Rosenfeld, San Diego, USA). GR (GRP20-Antikörper, Santa Cruz) und N-CoR (N-terminaler N-CoR-Antikörper, AG Heinzl) wurden mittels Western Blot detektiert.

Rekombinantes GR-Protein wurde mit einem Ganzzellextrakt aus der MCF-7-Zelllinie (Quelle für RAR, RXR und N-CoR) zusammen eingesetzt. Als biotinylierte DNA-Oligos wurden TAT, ein Element des FasLiganden-Promotors (FasL) und ein nGRE des Pro-opiomelanocortin-

Promotors (POMC) eingesetzt. Das DR5-Bindungs-element (direct repeat 5) ist ein klassisches Bindungs-element für das RAR/RXR-Heterodimer. Für dieses Element konnte gezeigt werden, dass es den Korepressor NCoR nur in Gegenwart von RAR-Antagonisten (ant.) bindet, nicht jedoch in Gegenwart des RAR-Agonisten All-trans-Retinsäure (ATRA). Es diente daher als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde wieder das TATmut-Element eingesetzt. Die Bindungs-elemente wurden wie in Abbildung 30 dargestellt, in der Gegenwart des GR-Agonisten Dexamethason oder in Gegenwart des GR-Antagonisten RU486 mit den entsprechenden DNA-Elementen inkubiert. Weder GR, noch RAR/RXR oder N-CoR binden die Negativkontrolle. Das TAT-Element (GRE) präzipitiert den Korepressor NCoR nur in Gegenwart des Antagonisten RU486, während in Gegenwart des GR-Agonisten Dexamethason keine Bindung von NCoR nachweisbar ist. Die nGRE-Bindungs-elemente des POMC- und des FasL- Promotors binden den Korepressor N-CoR in Gegenwart des Agonisten Dexamethason, obwohl der Glucocorticoid-Rezeptor in Abwesenheit von DNA (Co-Immunpräzipitation, Abbildung 29) dazu nicht in der Lage ist. Die DNA-Bindung des Glucocorticoid-Rezeptors hat offensichtlich einen Einfluss auf die Konformation des Rezeptors, und beeinflusst dessen Bindungsverhalten gegenüber Kofaktoren.

Die bisher vorgestellten DNA-Bindungs-elemente haben eine Länge von ca. 30-50 Basenpaaren, und die Experimente finden somit weitgehend losgelöst vom Chromatinkontext statt. Deshalb ist es von großem Interesse zu überprüfen, in wieweit Chromatin-assoziierte Proteine bei dem ABCD-Bindungstest vorhanden sind. Im folgenden Experiment (Abbildung 31) wurde überprüft, ob das Chromatin-assoziierte Protein HMG 1 (high mobility group 1) an die DNA-Elemente bindet. Als Quelle für GR und HMG 1 diente ein Ganzzellextrakt aus dem Gehirn der Maus.

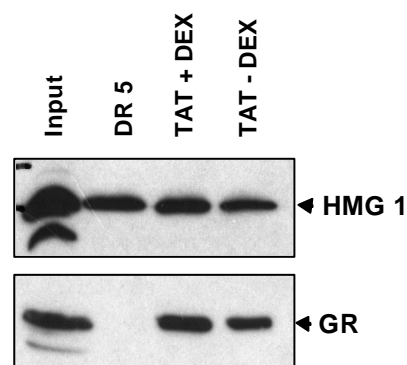


Abbildung 31 ABCD-Bindungstest von GR und HMG-1

Ein Gewebezellextrakt aus dem Gehirn der Maus wurde mit dem GR-Agonisten Dexamethason oder mit dem GR-Antagonisten RU486 inkubiert. Als biotinylierte DNA-Oligos wurden TAT und ein DR5-Bindungs-element eingesetzt. Das DR5-Bindungs-element (direct repeat 5) ist ein klassisches Bindungs-element für das RAR/RXR-Heterodimer. Das präzipitierte endogene Chromatin-assoziierte Protein HMG-1 (HMG-1-Antikörper, Transduktion Laboratories) und GR (GRP20-Antikörper, Santa Cruz) wurden mittels Western Blot detektiert.

HMG-1 bindet sowohl das RAR/RXR-Bindungselement DR5 als auch das positive GRE des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT). Dieses Experiment zeigt, dass neben GR auch das Chromatin-assoziierte Protein HMG 1 auf den kurzen DNA-Bindungselementen anwesend ist. Auch die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 können im ABCD-Bindungstest nachgewiesen werden, sie binden jedoch spezifisch nur in Anwesenheit des Glucocorticoid-Rezeptors (vgl. Kapitel 4.5).

4.4. Konformation des Glucocorticoid-Rezeptors

In Abbildung 30 konnte gezeigt werden, dass die DNA-Sequenz der eingesetzten Bindungselemente offensichtlich einen Einfluss auf die Konformation des Glucocorticoid-Rezeptors hat, da sie die Rekrutierung des Korepressors N-CoR beeinflusst. Man kann eine Konformationsänderung durch einen tryptischen Verdau nachweisen. Wenn man ein Protein mit der Protease Trypsin inkubiert, so wird dieses komplett verdaut. Trypsin gehört zusammen mit Chymotrypsin zu den Serin-Proteinasen, bei welchen sich Histidin und Serin im katalytischen Zentrum gehören. Trypsin spaltet Proteine an den spezifischen Schnittstellen Lysin-X und Arginin-X, während Chymotrypsin bei Leucin-X, Phenylalanin-Y und Tyrosin-Y spaltet. Bei einem sehr kurzen Verdau entstehen zunächst für das Protein spezifische Fragmente, da das Enzym zuerst an den am besten zugänglichen Stellen schneidet. Wenn ein Protein in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, sind jeweils unterschiedliche Erkennungsstellen der Protease bevorzugt an der Oberfläche exponiert und damit entstehen die proteintypischen Fragmente zu einem anderen Zeitpunkt. Die entstehenden Bandenmuster beim proteolytischen Verdau erlauben somit einen Rückschluss auf die Konformation des Proteins.

GR gebunden an die DNA-Bindungselemente eines GREs und eines nGREs (TAT bzw. POMC-Dimer) wurde im tryptischen Protease-Verdau eingesetzt (Abbildung 32). Die entstehenden Fragmente wurden mittels Western Blot detektiert (GRE20-Antikörper). Da positive GREs eine höhere Bindungsaffinität zu GR haben, wurde entsprechend weniger des biotinylierten TAT-Bindungselementes eingesetzt (50 %). Für das Experiment wurde rekombinanter GR verwendet. Für jedes Bindungselement wurden 4 Proben eingesetzt, die nach Bindung des GR unterschiedlich lang mit Trypsin inkubiert wurden. Der an das positive TAT-Bindungselement gebundene GR wird schneller tryptisch verdaut als der an das negative POMC-Element gebundene Rezeptor. Der eingesetzte GRE20-Antikörper detektiert N-terminale GR-Fragmente (vgl. Tabelle auf Seite 44, GR-Antikörper) Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit weiteren GR-Antikörpern anderer Spezifität (GR P20, Santa Cruz [C-Terminus]; GRPA-511, dianova [aa 346-367]; GRPA-512, dianova [aa 245-259])) ergab keine weiteren tryptischen Fragmente. Auch wenn vom Hersteller des GRE20-Antikörpers leider keine exakte Angabe zur Antikörperspezifität zur Verfügung steht, kann man doch sagen, dass alle detektierten GR-Fragmente vom N-terminalen Bereich des GR stammen. GR liegt

auf dem nGRE in einer Konformation vor, welche den Rezeptor länger vor dem tryptischen Verdau schützt. Dieses Experiment stützt somit die Hypothese der allosterischen Modulation der Rezeptorkonformation durch unterschiedliche Bindungselemente.

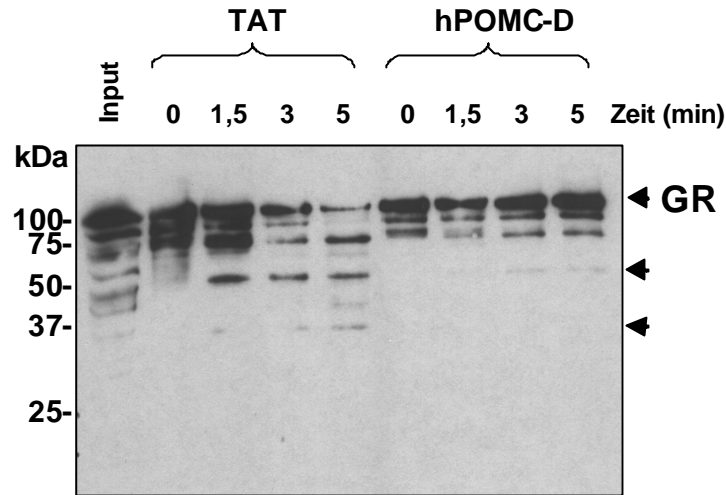


Abbildung 32: Vergleich positiver und negativer GREs im partiellen Proteaseverdau

Rekombinanter GR gebunden an das GRE des TAT-Bindungselementes bzw. an das nGRE des humanen POMC-Dimer-Bindungselementes wurde im tryptischen Protease-Verdau eingesetzt. Der immobilisierte GR wurde tryptisch verdaut und mit einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für jedes Bindungselement wurden 4 Proben eingesetzt, die nach Bindung des GR unterschiedlich lang mit Trypsin inkubiert wurden. Die entstehenden Fragmente wurden mittels Western Blot detektiert (GR E20, Santa Cruz)

4.5. Affinitätsreinigung von Kofaktoren des GR

Der ABCD-Bindungstest kann zur Detektion von GR-assoziierten Proteinen eingesetzt werden. Für die Detektion im Western Blot benötigt man jedoch immer die entsprechenden Antikörper. Zur Identifikation neuer GR-Interaktionspartner ist der Western Blot deshalb nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde GR mit einem auf dem ABCD-Bindungstest basierenden Verfahren aufgereinigt, um anschließend GR-assoziierte Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

Bevor Kofaktoren präzipitiert werden können, muss der Glucocorticoid-Rezeptor sauber aufgereinigt werden. Dazu wird der ABCD-Bindungstest eingesetzt. Um unspezifische Hintergrundbindung möglichst zu reduzieren, werden kurze DNA-Sequenzen eingesetzt, damit alle unspezifisch DNA-bindenden Proteine auf ein Minimum reduziert werden können. Des Weiteren wird ein weiterer Reinigungsschritt eingeführt, die Oligo-Elution (ABCDE-Proteinaufreinigung). Dabei wird ein nicht-biotinyliertes Bindungselement mit starker Affinität zu GR im 10-fachen Überschuss eingesetzt, um GR und assoziierte Proteine von der Streptavidin-Sepharosematrix zu eluieren. Abbildung 33 zeigt die Präzipitation von rekombinantem GR aus SF9-Zellextrakten in Gegenwart von Dexamethason, welcher anschließend von der

Matrix eluiert wurde. GR wurde parallel sowohl im Western Blot (GRP20 Antikörper, Santa Cruz), als auch in der Silberfärbung detektiert. Während der Western Blot nur spezifisch den GR detektiert, werden in der Silberfärbung alle gebundenen Proteine sichtbar.

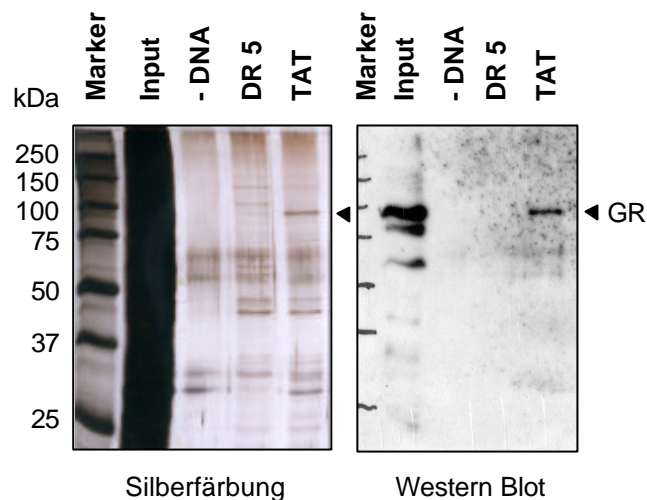


Abbildung 33: ABCD-Bindungstest zur Aufreinigung von rekombinatem GR

Das TAT-Bindungselement wurde zur Aufreinigung von rekombinatem GR eingesetzt. Eine Probe ohne DNA-Element und eine weitere Probe mit dem DR5-Bindungselement dienen als Negativkontrollen. Die Proben wurden parallel auf zwei 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Ein Gel wurde silbergefärbt, das zweite Gel wurde im Western Blot mit dem GR P20-Antikörper (Santa Cruz) detektiert.

Das TAT-Bindungselement wurde zur Aufreinigung von rekombinatem GR eingesetzt. Das DR5-Element und eine Probe ohne DNA-Element dienen als Negativkontrolle. Der Glucocorticoid-Rezeptor ist im Silbergel bei relativ geringem Hintergrund deutlich sichtbar. Einige unspezifisch DNA-bindenden Proteine, die auch in der Negativkontrolle auftreten sind zu erkennen. Der Vergleich des Inputs im Silbergel und im Western Blot (gleiche Menge) zeigt, dass die Aufreinigung erfolgreich war.

Um GR-assoziierte Proteine zu binden, wurde nach der Immobilisierung des GR (in Gegenwart von Dexamethason) auf der Streptavidin-Sepharosematrix und mehrmaligem Waschen der so entstandene GR-DNA-Komplex mit einem HeLa-Ganzzellextrakt inkubiert. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die vorher von der Streptavidin-Sepharose eluierten Proteine mittels Silberfärbung detektiert (Abbildung 34). GR konnte mit dem TAT-Bindungselement erfolgreich präzipitiert werden. Zusätzlich kann man drei spezifisch das TAT-Bindungselement bindende Proteine erkennen (mit Dreiecken markiert). Diese Proteine treten in der Negativkontrolle (DR5-Element) nicht auf, d.h. sie binden spezifisch nur in Anwesenheit des Glucocorticoid-Rezeptors.

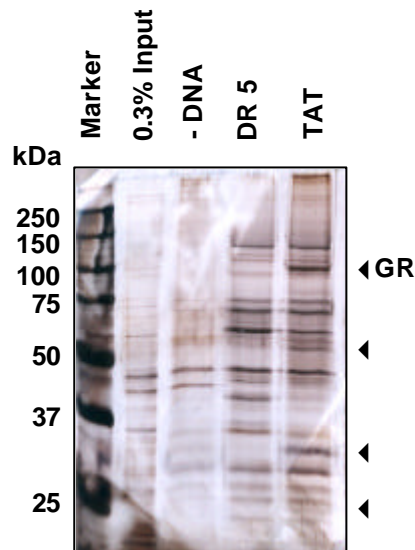


Abbildung 34: Die ABCDE-Proteinaufreinigung: Elution von GR-assoziierten Proteinen

Das TAT-Bindungselement wurde zur Aufreinigung von rekombinantem GR und von GR-assoziierten Proteinen eingesetzt. Eine Probe ohne DNA-Element und eine weitere Probe mit dem DR5-Bindungselement dienten als Negativkontrollen. Die Proben wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

Abbildung 35 zeigt ein vergleichbares Silbergel mit niedrigerer Acrylamidkonzentration, welches im höhermolekularen Bereich eine bessere Auflösung zeigt. Eine spezifische Proteinbande bei 250 kDa wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch sequenziert. Aufgrund der zu geringen Proteinkonzentration konnte das Protein leider nicht identifiziert werden. Von den bekannten Kofaktoren, die mit GR oder anderen Nukleären Rezeptoren interagieren, läuft keines im SDS-Gel bei 250 kDa, so dass diese Bande auch nicht im Western Blot überprüft werden konnte.



Abbildung 35: ABCDE -Proteinaufreinigung, Sequenzierung eines 250kDa-Proteins

Das TAT-Bindungselement wurde zur Aufreinigung von rekombinantem GR und von GR-assoziierten Proteinen eingesetzt. Eine Probe mit dem TATmut-Bindungselement diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden auf einem 7%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

Da die Massenspektrometrie bei silbergefärbten Gelen in der Praxis erhebliche Schwierigkeiten bereitet, wurden die Gele im folgenden mit kolloidalem Coomassie Blue gefärbt. Abbildung 36 zeigt ein mit kolloidalem Coomassie gefärbtes Gel im Vergleich mit der Silberfärbung. Auch wenn GR auf beiden Gelen gleich gut zu erkennen ist, so ist die Sensitivität des kolloidalen Coomassie doch gerade bei Proteinen niedriger Konzentration etwas geringer im Vergleich zur Silberfärbung.

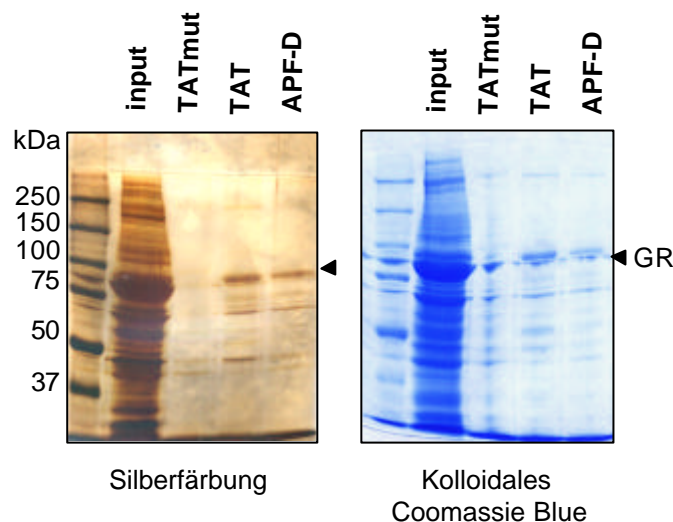


Abbildung 36: Gelfärbung mit kolloidalem Coomassie Blue

Das TAT-Bindungselement und das AFP-D-Bindungselement wurden zur Aufreinigung von rekombinantem GR eingesetzt. Eine Probe mit dem TATmut-Bindungselement diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden parallel auf zwei 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Ein Gel wurde silbergefärbt, das zweite Gel wurde mit kolloidalem Coomassie Blue gefärbt.

Da die Kontamination mit Keratinen die Massenspektrometrie erheblich behindert, wurde im Folgenden nur ein Teil der Probe elektrophoretisch aufgetrennt, und der eigentliche Gellauf und die Sequenzierung fanden bei Boehringer Ingelheim in Ridgefield statt. Abbildung 37 zeigt ein solches Gel. Der auf der Matrix immobilisierte Glucocorticoid-Rezeptor wurde mit zwei verschiedenen Ganzzellextrakten inkubiert (HeLa und 293T). Die ABCDE-Proteinaufreinigung wurde mit Bindungselementen des TAT (GRE) und des α -Fetoprotein-Promotors (nGRE) durchgeführt. Die mit farbigen Dreiecken markierten Banden konnten mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die identifizierten Proteine sind in der Abbildung angegeben.

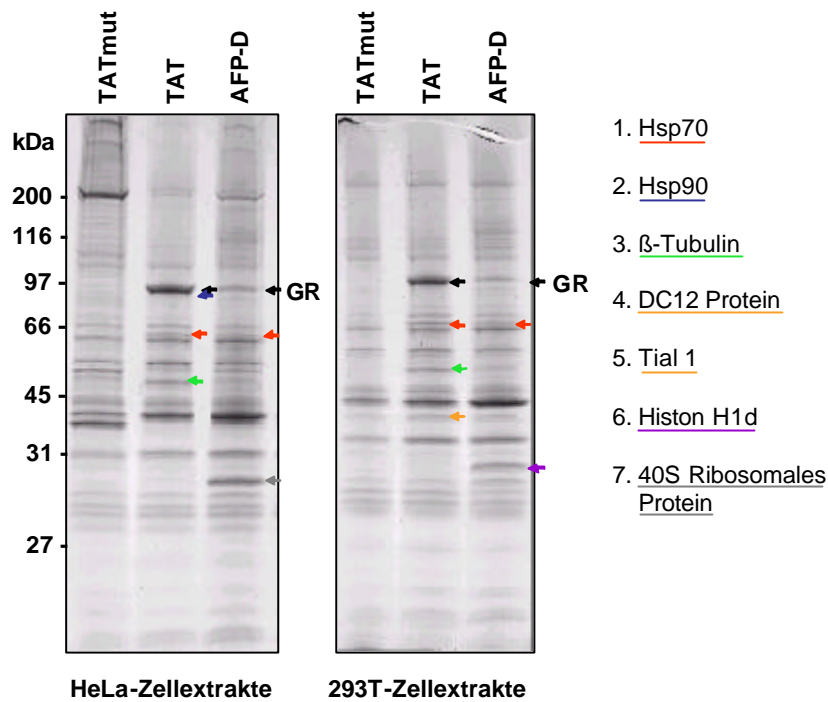


Abbildung 37: ABCDE-Proteinaufreinigung, massenspektrometrische Analyse

Das TAT-Bindungs-element und das AFP-D-Bindungs-element wurden zur Aufreinigung von rekombinantem GR und von GR-assoziierten Kofaktoren eingesetzt. Eine Probe mit dem TATmut-Bindungs-element diente als Negativkontrolle. Die Proben wurden parallel mit zwei verschiedenen Zellextrakten inkubiert, von der Matrix eluiert und auf Trockeneis zur massenspektrometrischen Analyse gesendet. Die Auftrennung erfolgte auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie Blue gefärbt und die von der Negativkontrolle unterschiedlichen Banden wurden sequenziert (Vladimir Papov, BI Ridgefield, USA). Die identifizierten Proteine sind in der Abbildung markiert und aufgelistet.

4.6. Sequenzanalyse der nGREs

Untersuchungen von S. Baumann (AG Krammer, DKFZ) und W. Schmid (AG Schütz, DKFZ) ergaben Anhaltspunkte für potenzielle nGRE-Bindungssequenzen in den Promotoren von FasL (vgl. Kapitel 1.8.2) und SOCS-3 (vgl. Kapitel 1.8.3). Beide Genprodukte sind in die anti-inflammatorische Aktivität des GR involviert. Positive und negative GREs haben unterschiedliche Konsensussequenzen. Ein klassisches GRE besteht aus palindromischen Erkennungssequenzen mit dem Konsensus 5'-GGTACA nnn TGTTCT-3', während bei nGREs nur das 3' Bindungs-element konserviert ist (Abbildung 38). Für nGREs ist bisher keine festgelegte Bindungssequenz publiziert worden. Um die oben genannten Promotoren hinsichtlich potenzieller GR-Bindungsstellen zu analysieren, wurden bekannte nGRE-Bindungssequenzen hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten untersucht. Abbildung 38 zeigt eine Auflistung verschiedener nGREs und deren Gemeinsamkeiten im Vergleich zum GRE-Konsensus. Bei der Entwicklung eines Suchmusters für neue nGREs wurden alle Gemeinsamkeiten berücksichtigt. Als Ergebnis dieses Vergleiches wurde das Muster XKXXXXXXXXWGDXCW (IUPAC Nomenklatur) zur Analyse von Promotoren, welche durch GR-Agonisten reprimiert werden ein-

gesetzt. Die Analyse wurde mit dem Programm ‚search pattern‘ der HUSAR-Software (DKFZ) durchgeführt. Das Suchmuster ist wegen der schlechten Konservierung der bekannten nGREs sehr weit definiert und liefert auch Sequenzen, die nicht in der Lage sind GR zu binden. Sequenzen, welche in der Mitte des konservierten Hexamers nur aus G und C bestanden (z.B. TGCCCT) wurden aufgrund ihrer Struktur ausgeschlossen. Die übrigen Sequenzen wurden im ABCD-Bindungstest bezüglich ihrer Affinität zu GR untersucht.

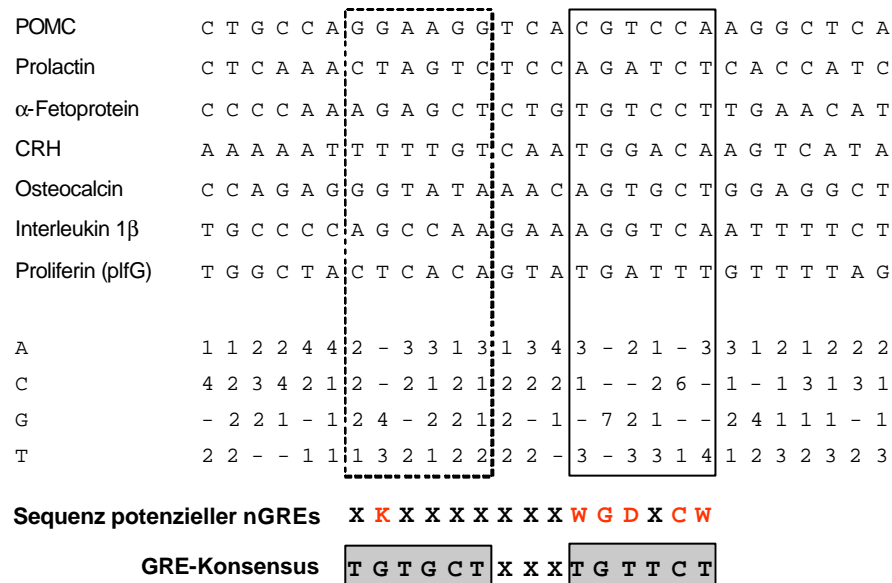


Abbildung 38: Entwicklung eines Suchmusters für potenzielle nGREs

Negative GREs zeigen nur eine schlechte Konservierung, wie der Vergleich von Elementen verschiedener Promotoren zeigt. Das Suchmuster XKXXXXXXXXXWGDXCW (IUPAC Nomenklatur) vereinigt alle bisher charakterisierten nGRE-Elemente und ermöglicht eine *in silico*-Analyse von Promotoren, die potenziell durch nGREs reguliert werden. Da das Suchmuster aufgrund seiner offenen Definition auch Elemente ermittelt, die den GR nicht binden, werden die erhaltenen Ergebnis-Sequenzen im ABCD-Bindungstest auf ihre Bindungsaffinität zu GR überprüft. (Abbildung nach Dostert und Heinzel 2002).

4.7. Der Luciferase-Reportergentest zur Unterscheidung von Cis- und Trans-Repression

Um GC-reprimierbare Zielgene auf den Mechanismus der Repression hin zu untersuchen, bedarf es einer Methode, die Cis- und die Trans-Repression voneinander zu unterscheiden. In Kapitel 1.3.2 wurden die GR^{dim/dim}-Mäuse vorgestellt, deren Glucocorticoid-Rezeptor aufgrund einer Punktmutation in der D-Schleife der DNA-Bindungsdomäne (A458T) nicht mehr zur DNA-Bindung als Dimer in der Lage ist, und demzufolge nur noch Gene über den Mechanismus der Trans-Repression reguliert. Eine Möglichkeit der Unterscheidung der beiden Mechanismen ist somit die vergleichende Untersuchung der Genregulation in den Geweben der GR^{dim/dim} und der GR^{wt}-Mäuse. Um in Microarray-Daten ermittelte Gene weiter zu untersuchen, und um die Ergebnisse auch auf die humanen Promotoren zu übertragen, stellt der

Luciferase-Reportergentest eine geeignete Untersuchungsmethode dar. Dabei wird der entsprechende Promotor in einen geeigneten Luciferase-Vektor kloniert, und die Reprimierbarkeit dieses Konstrukts in Anwesenheit verschiedener Mutanten des Glucocorticoid-Rezeptors ermittelt. Die Methode wurde zuerst an bereits charakterisierten Promotoren überprüft. Als Modellsystem für den Mechanismus der Trans-Repression diente der Collagenase I-Promotor, und als Modellsystem für die Cis-Repression der POMC-Promotor. Um die Ergebnisse mit einem klassischen positiven GRE vergleichen zu können, wurde der MMTV-Promotor ausgewählt. Als humane GR-Expressionskonstrukte wurden hGR (GR-Wildtyp), A458T (die homologe humane Variante der Mutation im murinen GR), und 4DX (enthält drei weitere Mutationen) eingesetzt (vgl. Kapitel 1.3.2). Die Mutanten A458T und 4DX unterscheiden sich im Mausmodell dadurch, dass die murine Variante der 4DX-Mutation lethal ist im Gegensatz zur A458T-Mutation. Für die Transfektionen im 12-Loch-Plattenformat wurde die humane Zelllinie HepG2 (Leberzellkarzinom) verwendet.

4.7.1. Der Collagenase 1-Promotor

Der Vektor mit dem Collagenase 1-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit PMA (Phorbolmyristolacetat) oder mit PMA und Dexamethason behandelt. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Abbildung 39 zeigt das Ergebnis in graphischer Darstellungsweise.

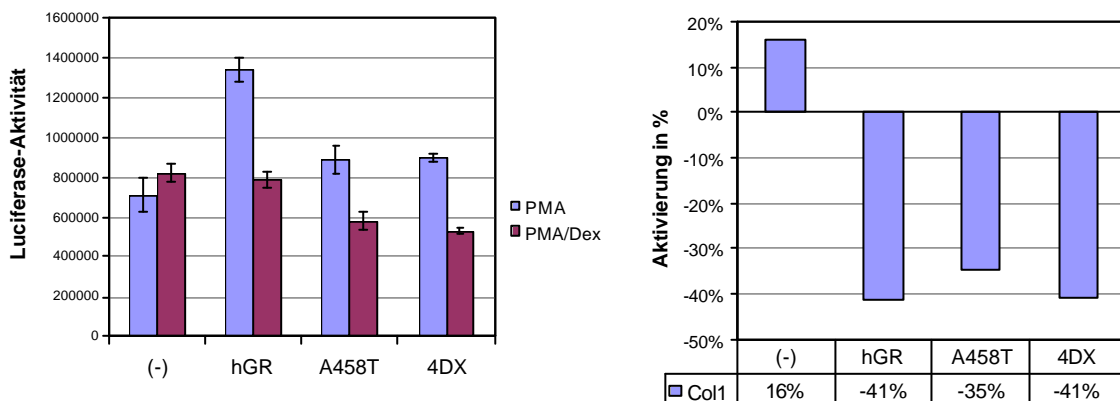


Abbildung 39: Luciferase-Reportergentest mit dem Collagenase-Promotor

Der Vektor mit dem Collagenase 1-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit PMA (Phorbolmyristolacetat) oder mit PMA und Dexamethason behandelt. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent.

Wie man an der Transfektion ohne GR (-) erkennt, wird der Collagenase I-Vektor hier zwar durch PMA aktiviert, kann aber nicht durch Dexamethason reprimiert werden. Obwohl HepG2-Zellen endogenen Glucocorticoid-Rezeptor enthalten, ist dieser entweder nicht funktionell oder nicht in ausreichender Menge vorhanden, um in einem Luciferase-Reportergentest einen Effekt zu bewirken. Dagegen bewirkt die Kotransfektion von Wildtyp-GR (hGR) eine deutliche Repression des Collagenase I-Vektors in Gegenwart von Dexamethason. Auch die Mutanten A458T und 4DX ergeben eine Repression durch Dexamethason in etwa gleichem Umfang. Auffällig ist, dass die hGR-Kotransfektion die Gesamtaktivität des Collagenase I-Vektors verstärkt. Möglicherweise spielt hier die DNA-abhängige Genregulation von indirekt beteiligten Proteinen durch GREs oder nGREs eine Rolle.

4.7.2. Der POMC-Promotor

Der Vektor mit dem POMC-Promotor (Pro-opiomelanocortin) wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrollen). Abbildung 40 zeigt das Ergebnis des Luciferase-Reportergentests in graphischer Darstellungsweise. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent.

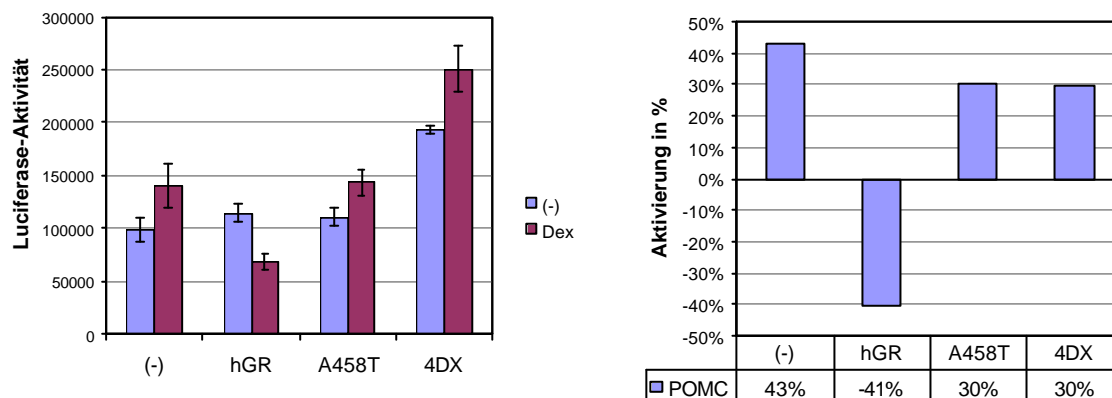


Abbildung 40: Luciferase-Reportergentest mit dem POMC-Promotor

Der Vektor mit dem POMC-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (im Vergleich gegen unbehandelte Zellen). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent.

Ohne kotransfizierten GR (-) kann der POMC-Vektor wie auch der Collagenase I-Vektor nicht durch Dexamethason reprimiert werden. Dagegen bewirkt die Kotransfektion von Wildtyp-GR (hGR) eine deutliche Repression des POMC-Vektors in Gegenwart von Dexamethason. Im

Unterschied zum Collagenase I-Vektor (Trans-Repression), führt die Kotransfektion der Mutanten A458T und 4DX bei dem POMC-Vektor (Cis-Repression) nicht zu einer Repression durch Dexamethason. Die beiden Mutanten unterscheiden sich untereinander nicht in ihrer Reaktion auf Dexamethason.

Im Luciferase-Reportergentest kann zwischen den beiden Mechanismen der Trans- und der Cis-Repression unterschieden werden, indem man die Repression des Konstruktes durch Glucocorticoide in Gegenwart der Mutante A458T oder 4DX miteinander vergleicht. Die GR-Mutanten A458T und 4DX können nur über den Mechanismus der Trans-Repression reprimieren und sind nicht zu Cis-Repression, wie sie bei nGREs abläuft, in der Lage.

4.7.3. Der MMTV-Promotor

Der MMTV-Promotor (mouse mammary tumor virus) ist ein klassischer GR-abhängiger Promotor, welcher meist zu Studien des Mechanismus positiver GREs herangezogen wird. In diesem Experiment (Abbildung 41) wurde überprüft, wie der MMTV-Promotor unter den hier verwendeten Bedingungen reagiert. Die Abbildung zeigt das Experiment unter exakt den gleichen Bedingungen wie die beiden Experimente mit dem POMC- und dem Collagenase I-Promotor.

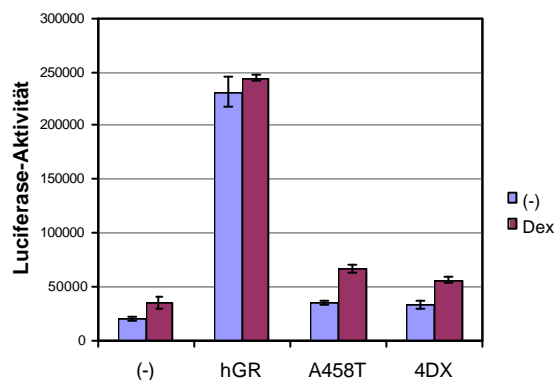


Abbildung 41: Luciferase-Reportergentest mit dem MMTV-Promotor

Der Vektor mit dem MMTV-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (im Vergleich gegen unbehandelte Zellen). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Der Test wurde wie alle bisherigen Experimente mit normalem FCS durchgeföhrt.

Ohne kotransfiziertem GR (-) reagiert auch der MMTV-Vektor nicht auf Dexamethason. Dagegen bewirkt die Kotransfektion von Wildtyp-GR (hGR) bereits eine deutliche Aktivierung des MMTV-Vektors auch ohne Behandlung der Zellen mit Dexamethason. Zur Aktivierung des MMTV-Promotors in Gegenwart von kotransfiziertem hGR reichen offensichtlich bereits

kleinste Mengen an Glucocorticoiden aus, wie sie in dem verwendeten FCS vorhanden sind. Im Gegensatz zum Wildtyp-hGR können die beiden Mutanten A458T und 4DX den MMTV-Promotor nur schwach aktivieren. Da für die Aktivierung des MMTV-Promotors durch Dexamethason die DNA-Bindung des GR benötigt wird, war dieses Ergebnis zu erwarten. Trotzdem ist die hier zu sehende schwache Aktivierung vermutlich von essenzieller Wichtigkeit für das Überleben der in Kapitel 1.3.2 vorgestellten GR^{dim/dim}-Mäuse, da es sich bei den bisher charakterisierten GRE-regulierten Genen um metabolische Enzyme der Gluconeogenese handelt. Die Behandlung der Zellen mit Dexamethason führt bei den Mutanten zu einer stärkeren Aktivierung als bei dem kotransfizierten Wildtyp-Glucocorticoid-Rezeptor. Offensichtlich wird bei den Mutanten eine höhere Dex-Konzentration benötigt, um überhaupt eine schwache Aktivierung des Promotors zu erreichen.

Abbildung 42 rechts zeigt das gleiche Experiment mit gestripptem (d.h. Steroid-depletiertem) FCS. Man erkennt, dass die unbehandelten Proben hier eine deutlich schwächere Aktivierung zeigen als in dem vorherigen Experiment. Die im FCS enthaltene endogene Glucocorticoid-Konzentration reicht also bereits aus, damit eine ausreichende Menge von GR in den Zellkern wandert und dort das GRE aktiviert, wohingegen die nGREs unter den selben Bedingungen noch keinerlei Repression zeigen. Möglicherweise setzt die Repression der nGREs erst bei deutlich höheren Konzentrationen ein.

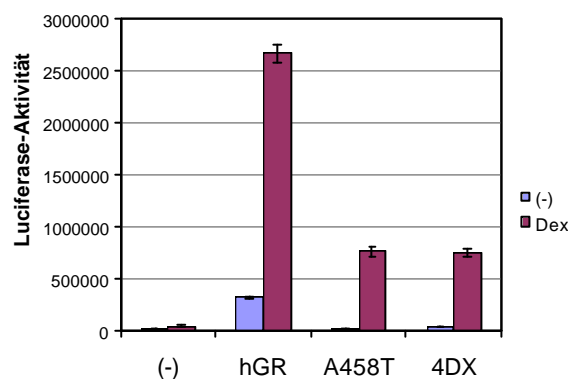


Abbildung 42: Luciferase-Reportergentest mit dem MMTV-Promotor (gestripptes FCS)

Der Vektor mit dem MMTV-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (im Vergleich gegen unbehandelte Zellen). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Tripletts durchgeführt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Tripletts. Der Test wurde mit gestripptem (d.h. Steroid-depletiertem) FCS durchgeführt.

Auch bei dem MMTV-Promotor kann man die DNA-bindungsabhängige Aktivierung durch Kotransfektion der GR-Mutanten klar von den DNA-bindungsunabhängigen Mechanismen unterscheiden. Somit kann der Luciferase-Reportergentest zu Unterscheidung der verschie-

denen Mechanismen Trans-Repression (Collagenase I), Cis-Repression (POMC) und Cis-Aktivierung (MMTV) bei Promotoren mit unbekanntem GR-Bindungsverhalten eingesetzt werden.

4.8. Der FasL (CD95L)-Promotor

Es ist bereits seit Langem publiziert, dass die Transkription des FasL-Gens durch Glucocorticoide reprimiert wird, jedoch war der dazu gehörige Mechanismus nicht bekannt (Yang *et al.* 1995; Cui *et al.* 1996). Durch Experimente mit den GR^{dim/dim}-Mäusen konnte im Labor von Peter Krammer (DKFZ) gezeigt werden, dass es sich um einen DNA-bindungsabhängigen Mechanismus handeln muss (persönliche Mitteilung S. Baumann). Des Weiteren konnten indirekte Mechanismen über die DNA-abhängige Regulation anderer Proteine ausgeschlossen werden (S. Baumann).

4.8.1. Luciferase-Reportergentest

Im folgenden Experiment (Abbildung 43) wurde der Mechanismus der Dexamethason-vermittelten Repression des humanen FasL-Promotors analysiert. Der Vektor mit dem FasL-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin und Dexamethason behandelt (PMA/Ionomycin bzw. PMA/Ionomycin/Dexamethason, mit Ausnahme der Negativkontrolle). Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors kann pharmakologisch durch PMA (Phorbolmyristolacetat) und Ionomycin simuliert werden. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und Ionomycin aktiviert den Ca₂₊-Calicneurin-NFAT Signaltransduktionsweg. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Abbildung 43 zeigt das Ergebnis in graphischer Darstellungsweise. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent (PMA/Ionomycin im Vergleich zu PMA/Ionomycin/Dexamethason). Ohne kotransfizierten GR (-) kann auch der FasL-Vektor bei sehr niedriger Gesamtaktivität des FasL-Konstruktes nicht durch Dexamethason reprimiert werden. Dagegen bewirkt die Kotransfektion von Wildtyp-GR (hGR) eine weitaus höhere Aktivierung des FasL-Konstruktes und eine deutliche Repression des Vektors durch Dexamethason. Im Unterschied zum Collagenase I-Vektor (Trans-Repression), führt die Kotransfektion der Mutanten A458T und 4DX bei dem FasL-Vektor (Cis-Repression) nicht zu einer Repression durch Dexamethason. Die beiden Mutanten unterscheiden sich nicht in ihrer Reaktion auf die Behandlung der Zellen mit Dexamethason.

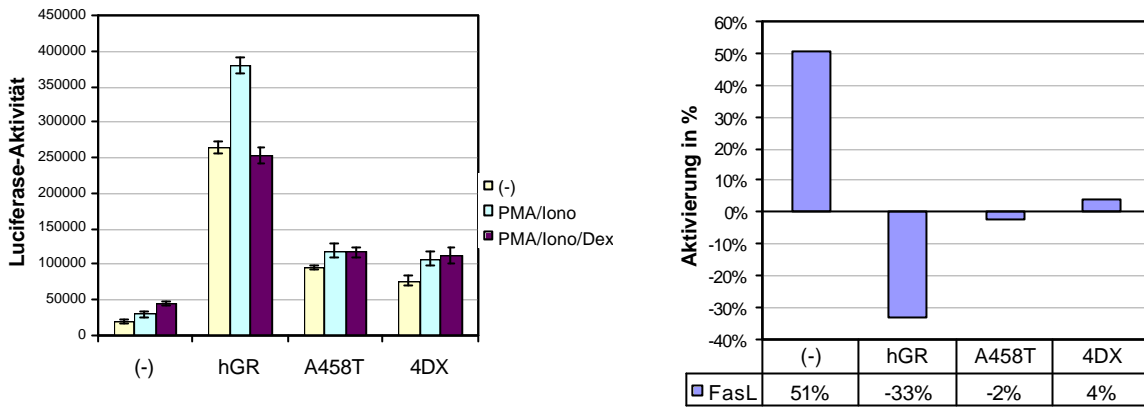


Abbildung 43: Luciferase-Reportergentest mit dem humanen FasL-Promotor

Der Vektor mit dem humanen FasL-Promotor wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit PMA/Ionomycin oder mit PMA/Ionomycin und Dexamethason behandelt. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Tripletts durchgeführt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Tripletts. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent.

Abbildung 44 zeigt die Repression durch Dexamethason von drei unabhängig voneinander durchgeführten Reportergentests. Die durch das hGR-Plasmid vermittelte Repression grenzt sich signifikant und reproduzierbar von den anderen drei Fällen ab. Alle drei Experimente konnten somit eindeutig zwischen dem Wildtyp-GR und den beiden Mutanten A458T und 4DX unterscheiden. Damit liefert der Luciferase-Reportergentest ein deutliches Indiz für nGRE-vermittelte Cis-Repression.

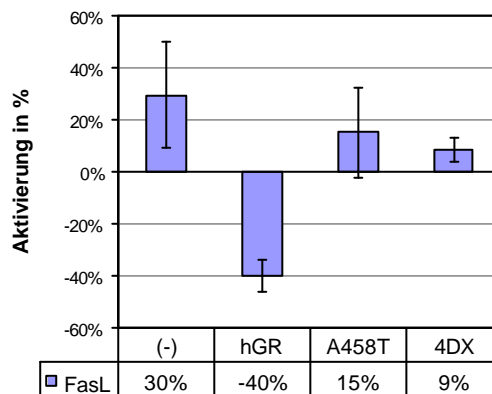


Abbildung 44: Der Luciferase-Reportergentest: Mittelwerte und Fehlerbalken

Drei unabhängig voneinander durchgeführte Reportergentests mit dem humanen FasL-Plasmid wurden auf ihre Reproduzierbarkeit hin analysiert. Die in der Grafik eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Promotoraktivierung in % durch Dexamethason. Die Transfektion des hGR-Plasmids ermöglicht eine Repression durch Dexamethason von 40 %, welche sich signifikant von den GR-Mutanten A458T und 4DX unterscheidet.

4.8.2. Ermittlung der Bindungsspezifität des GR

Wie schon in Kapitel 4.2 am Beispiel des POMC-Promotors gezeigt wurde, können biotinylierte PCR-Fragmente im ABCD-Bindungstest bezüglich vorhandener nGREs analysiert werden. Lange PCR-Produkte wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen einmal zerschnitten, um so kürzere biotinylierte Fragmente zu erhalten und damit die Position der möglichen nGRE-Bindungsstellen weiter einzugrenzen. Nach der Aufreinigung im Agarosegel wurden die Fragmente im ABCD-Bindungstest auf ihre Affinität zu GR überprüft. Zusätzlich wurde der Promotor *in silico* bezüglich seiner möglichen Bindungsstellen für GR analysiert (vgl. Kapitel 4.6). Abbildung 45 zeigt die Abschnitte des murinen FasL-Promotors, die sich nach der Promotoranalyse mittels der HUSAR-Software (DKFZ) als relevant ergeben haben. Die potenziellen nGREs sind rot markiert. Nach der Lage der potenziellen nGREs wurden die entsprechenden PCR-Produkte (hellgrün dargestellt) mit biotinylierten Primern amplifiziert und im ABCD-Bindungstest eingesetzt.

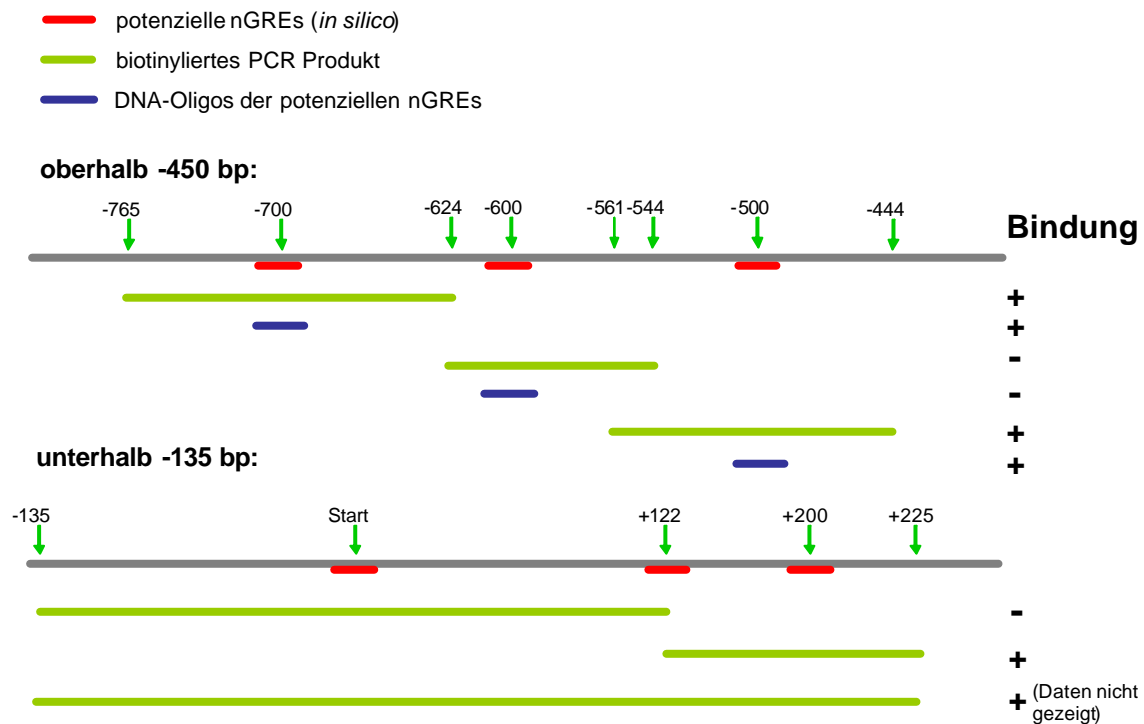


Abbildung 45: Potenzielle nGREs im FasL-Promotor

Die Fragmente von -765 bis -624 und von -624 bis -544 wurden durch Amplifizierung eines PCR-Fragmentes von -765 bis -544 und anschließenden Verdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym Hpy188I (schneidet bei -624) hergestellt. Das Fragment von -561 bis -444 wurde durch Amplifizierung eines PCR-Fragmentes von -561 bis -444 hergestellt. Die Fragmente von -135 bis +122 und von +122 bis +225 wurden durch Amplifizierung eines PCR-Fragmentes von -135 bis +255 und anschließenden Verdau des entstandenen PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym Bgl II (schneidet bei +122) hergestellt. Alle Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt, aus dem Gel aufgereinigt und im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Bindung des GR tatsächlich an der *in silico* vorhergesagten Stelle stattfindet, wurden parallel zu den PCR-Fragmenten biotinylierte Oligo-Sequenzen von ca. 30 bp eingesetzt (blau dargestellt).

Die DNA-Fragmente (Details siehe Legende von Abbildung 45) wurden durch Amplifizierung mittels PCR und anschließenden Verdau der entstandenen PCR-Produkte hergestellt. Alle Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt, aus dem Gel aufgereinigt und im ABCD-Bindungstest eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Bindung des GR tatsächlich an der *in silico* vorhergesagten Stelle stattfindet, wurden parallel zu den PCR-Fragmenten biotinylierte Oligo-Sequenzen von ca. 30 bp eingesetzt (blau markiert).

Abbildung 46 zeigt den zugehörigen ABCD-Bindungstest. Wie im Western Blot des ABCD-Bindungstests zu erkennen ist, bindet GR sowohl die PCR-Fragmente von -765 bis -624, von -561 bis -444 und von +122 bis +225. Die Fragmente von -624 bis -544 und von -135 bis +122 zeigen keinerlei Bindung des Glucocorticoid-Rezeptors. Von den biotinylierten DNA-Oligos -700, -600 und -500 binden die beiden Oligos bei -700 und -500. Das Oligo bei -600 zeigt keine GR-Bindung. Die Ergebnisse der kurzen DNA-Oligos stimmen mit den Resultaten der längeren PCR-Produkte überein (vgl. Abbildung 45).

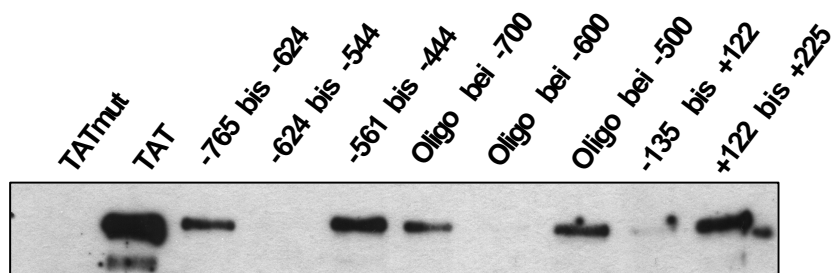


Abbildung 46: Der murine FasL-Promotor: ABCD-Bindungstest

Der ABCD-Bindungstest wurde mit den in Abbildung 45 beschriebenen biotinylierten PCR-Produkten und DNA-Oligos durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das Bindungselement des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT), als Negativkontrolle das entsprechende mutierte TATmut-Element. Es wurde ein Ganzzellextrakt der Jurkat-Zelllinie eingesetzt. GR wurde im Western Blot mit dem GRH300-Antikörper (Santa Cruz detektiert). Da positive GREs eine höhere Bindungsaffinität zu GR aufweisen als nGREs, wurde nur 50 % der TAT-Probe auf das SDS-Gel aufgetragen.

Jeweils zwei konservierte Basen wurden spezifisch und analog dem TAT-Element mutiert, um zu überprüfen, ob GR an die potenziellen nGREs des FasL-Promotors tatsächlich analog zu den bereits bekannten nGREs bindet. Abbildung 47 gibt einen Überblick über die eingesetzten Bindungselemente und deren spezifische Mutationen. Die mutierten Bindungselemente FasL-700mut und FasL500mut wurden im ABCD-Bindungstest auf ihre GR-Bindungsfähigkeit hin überprüft (Abbildung 48, gleiche Bedingungen wie im vorherigen Experiment). Wie in dem Western Blot des ABCD-Bindungstest zu erkennen ist, führt die spezifische Mutation der FasL-DNA-Oligos dazu, dass der Glucocorticoid-Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, das mutierte DNA-Element zu binden. Das Ergebnis zeigt, dass die Mutation der hochkonservierten Basen die DNA-Bindung komplett verhindert, und dass die vorhergesagte Struktur der potenziellen nGREs somit korrekt ist.

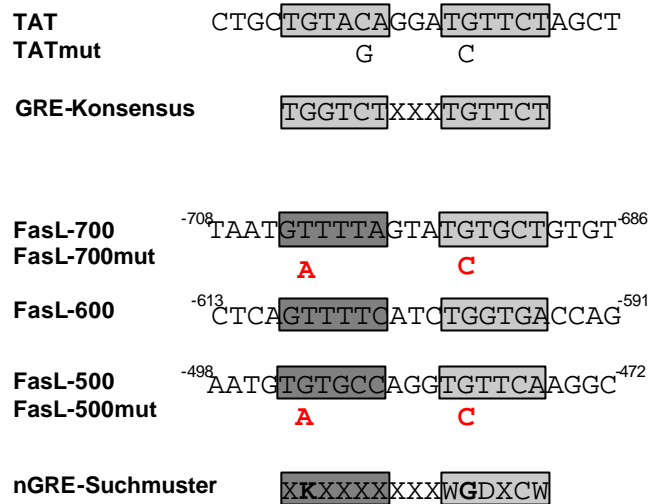


Abbildung 47: DNA-Sequenzen potenzieller nGREs und deren Mutation

Die Abbildung zeigt die eingesetzten DNA-Oligos und deren Mutation im Vergleich mit positiven GREs. Das TAT-Bindungsselement (oben) entspricht bis auf 1 bp dem GRE-Konsensus und wurde durch Mutation von zwei hochkonservierten Basenpaaren so verändert, dass es nicht mehr in der Lage ist, den GR zu binden (Negativkontrolle TATmut). Die *in silico* gefundenen nGREs des distalen murinen FasL-Promotors sind im Vergleich mit dem nGRE-Suchmuster dargestellt. Die konservierten Halbseiten sind hellgrau, die nicht konservierten Halbseiten dunkelgrau dargestellt. Die eingefügten Mutationen sind in rot dargestellt. Da das FasL-600-DNA-Element den GR *in vitro* nicht binden konnte, wurde es auch nicht mutiert.

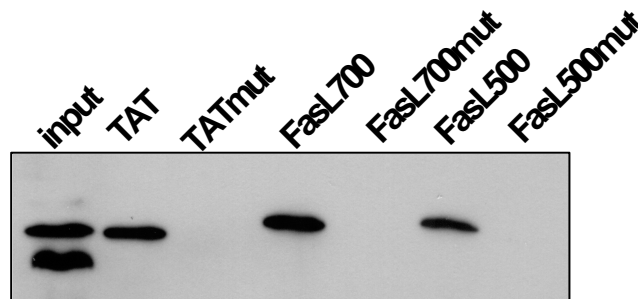


Abbildung 48: ABCD-Bindungstest: Spezifische Mutation der potenziellen nGREs

Der ABCD-Bindungstest wurde mit den in Abbildung 47 beschriebenen biotinylierten DNA-Oligos durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das Bindungselement des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT), als Negativkontrolle das entsprechende mutierte TATmut-Element. Es wurde ein Ganzzellextrakt der Jurkat-Zelllinie eingesetzt. GR wurde im Western Blot mit dem GRH300-Antikörper (Santa Cruz) detektiert. Da positive GREs eine höhere Bindungsaffinität zu GR aufweisen als nGREs, wurde nur 50 % der TAT-Probe auf das SDS-Gel aufgetragen.

Eine innerhalb der Arbeitsgruppe (N. Novac) durchgeführte Chromatin-Immunpräzipitation konnte zeigen, dass in der Zelle sowohl das DNA-Element bei -700 als auch das DNA-Element bei +135 von GR gebunden wird. Das potenzielle nGRE bei -500 bp scheint im Kontext der Zelle für den Glucocorticoid-Rezeptor durch die vorgegebene Chromatinstruktur oder durch die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren nicht zugänglich zu sein.

4.9. Der SOCS-3-Promotor

Durch Vergleiche der mRNA-Expressionsmuster zwischen GR^{dim/dim}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen in einer Microarray-Analyse von murinen T-Zellen konnte im Labor von Günther Schütz (DKFZ) gezeigt werden, dass der murine SOCS-3 Promotor durch Dexamethason reprimiert wird und dass es sich möglicherweise um einen DNA-bindungsabhängigen Mechanismus handelt. Um die Microarray-Resultate, die starken Schwankungen unterliegen und eine recht hohe Fehlerquote aufweisen können, zu bestätigen, wurden Luciferase-Reportergerentests mit dem murinen SOCS-3 Promotor unter den bei der Analyse des FasL-Promotors eingesetzten Bedingungen durchgeführt.

4.9.1. Luciferase-Reportergerentest

Im folgenden Experiment (Abbildung 49) wurde der Mechanismus der Dexamethason-vermittelten Repression des murinen SOCS-3-Promotors analysiert. Der Vektor mit dem SOCS-3-Promotor (-2757 bis +929) wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrolle). Abbildung 49 zeigt das Ergebnis des Luciferase-Reportergerentests in graphischer Darstellungsweise.

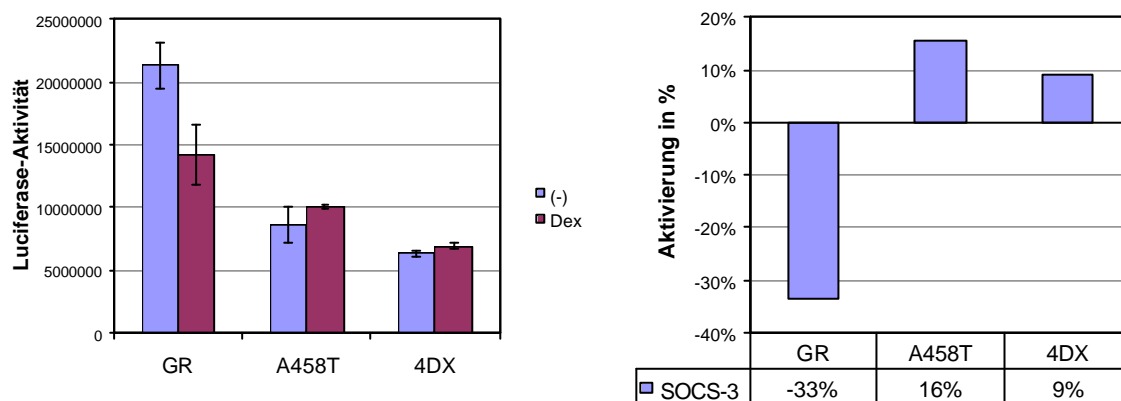


Abbildung 49: Luciferase-Reportergerentest mit dem murinen SOCS-3-Promotor

Der Vektor mit dem SOCS-3-Promotor (-2757 bis +929) wurde zusammen mit den verschiedenen GR-Mutanten in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergerentest durchgeführt. Der Reportergerentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason in Prozent.

Die Kotransfektion von Wildtyp-GR (hGR) bewirkt eine Aktivierung des SOCS-3-Konstruktes und eine deutliche Repression des Vektors durch Dexamethason. Im Unterschied zum Collagenase I-Vektor (Trans-Repression), führt die Kotransfektion der Mutanten A458T und 4DX

bei dem SOCS-3-Vektor (Cis-Repression) nicht zu einer Repression durch Dexamethason. Die beiden GR-Mutanten unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Reaktion auf die Behandlung der Zellen mit Dexamethason. Das Experiment zeigt, dass der SOCS-3-Promotor analog zum POMC-Promotor durch einen DNA-bindungsabhängigen Mechanismus reprimiert wird (Cis-Repression).

Im folgenden Experiment wurde versucht, die Lage des oder der nGREs mit Hilfe von verschiedenen langen Promotorkonstrukten einzugrenzen. Abbildung 51 (Seite 93) zeigt die verschiedenen Konstrukte, die freundlicherweise von S. Mehmed (Cedars-Sinai Medical Center, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Abbildung 50 zeigt den Luciferase-Reportergentest mit den verschiedenen SOCS-3-Konstrukten. Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie das vorherige Experiment mit dem Unterschied, dass in alle Zellen das hGR-Plasmid kotransfiziert wurde. In der graphischen Darstellung auf der rechten Seite ist die Repression in Prozent dargestellt.

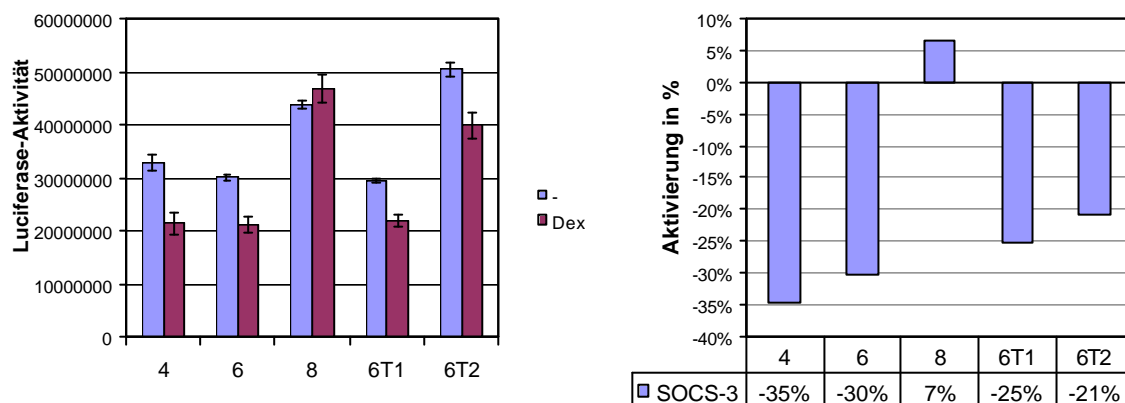


Abbildung 50: Luciferase-Reportergentest mit SOCS-3-Promotor-Konstrukten

Verschiedene Konstrukte des SOCS-3-Promotors (Klon 4, 6, 8, 6T1 und 6T2) wurden zusammen Wildtyp-GR (hGR) in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrollen). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression der verschiedenen Konstrukte durch Dexamethason in Prozent.

Wie zu erkennen ist, sind alle Konstrukte außer Klon 8 durch Dexamethason reprimierbar. Klon 8 (vgl. Abbildung 51) ist das kürzeste Konstrukt und wird durch Dexamethason nicht reprimiert. Daraus kann man schließen, dass sich das nGRE außerhalb der Region von -273 bis +160 befinden muss. Da alle anderen Klone reprimiert werden, scheint dass nGRE in einem Bereich zu liegen, der auch in alle diesen Klonen enthalten ist. Daher muss das GR-Bindungselement, welches die Dex-vermittelte Repression verursacht, im Bereich von -855 bis -273 liegt (in Abbildung 51 rot markiert). Da die Repression von Klon 4 stärker ist als die

Repression des kürzeren Klon 6T2, ist jedoch nicht auszuschließen, dass im distalen Bereich des SOCS-3-Promotors möglicherweise Bindungselemente liegen, die die GC-vermittelte Repression verstärken bzw. die GR-Bindung zu dem nGRE stabilisieren.

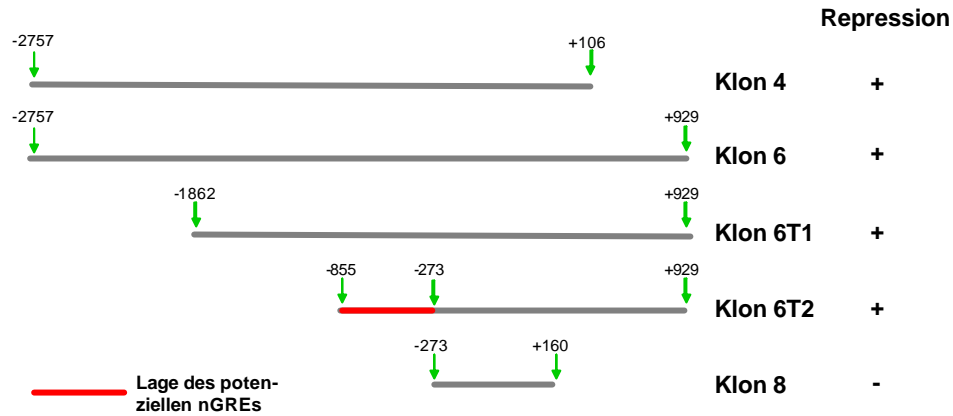


Abbildung 51: Verschiedene Promotorkonstrukte des murinen SOCS-3-Promotors

Die verschiedenen Promotorkonstrukte, die freundlicherweise von S. Mehmed (Cedars-Sinai Medical Center, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurden, sind hier schematisch dargestellt. Die Konstrukte wurden im Luciferase-Reportergentest (Abbildung 50) analysiert. Alle Konstrukte außer Klon 8 reagieren auf die Dexamethason-Behandlung mit Repression. Der einzige Promotorabschnitt, der in allen Konstrukten außer Klon 8 enthalten ist, wurde rot markiert. Man kann davon ausgehen, dass die GR-vermittelte Repression durch ein DNA-Element dieses Abschnittes vermittelt wird. (Abbildung modifiziert nach Auernhammer *et al.* 1999)

4.9.2. Ermittlung der Bindungsspezifität des GR

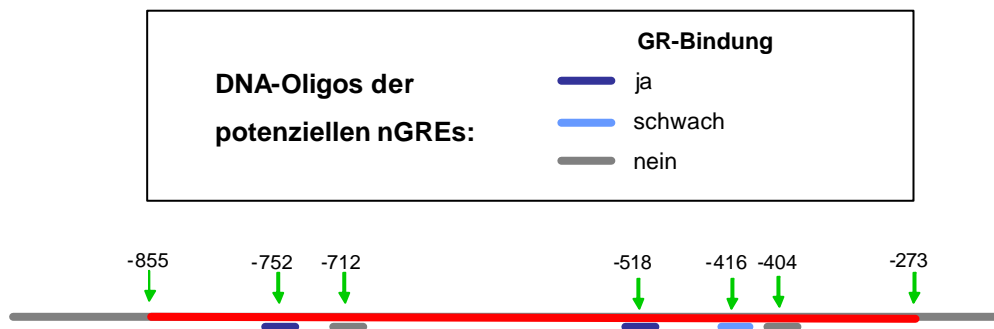


Abbildung 52: Potenzielle nGREs im SOCS-3-Promotor

Dargestellt ist der Abschnitt des murinen SOCS-3-Promotors, für den mit Hilfe des Luciferase-Reportergentests ermittelt wurde, dass er für die GR-vermittelte Repression verantwortlich ist. Die 5 ermittelten potenziellen nGREs sind eingezeichnet. Die im ABCD-Bindungstest (nächste Abbildung) ermittelten Ergebnisse sind bereits farblich dargestellt.

Abbildung 52 zeigt den Ausschnitt des murinen SOCS-3-Promotors, für den im Luciferase-Reportergentest potenzielle GR-Bindungsstellen ermittelt wurde. Es wurde eine *in silico*-Analyse dieses Promotorabschnitts durchgeführt. Aufgrund der Erfahrungen bei der nGRE-Bestimmung des murinen FasL-Promotors und der Kürze des zu untersuchenden Abschnitts

wurde auf die Herstellung von PCR-Produkten verzichtet und statt dessen gleich biotinylierte DNA-Oligos eingesetzt (blau und grau markiert).

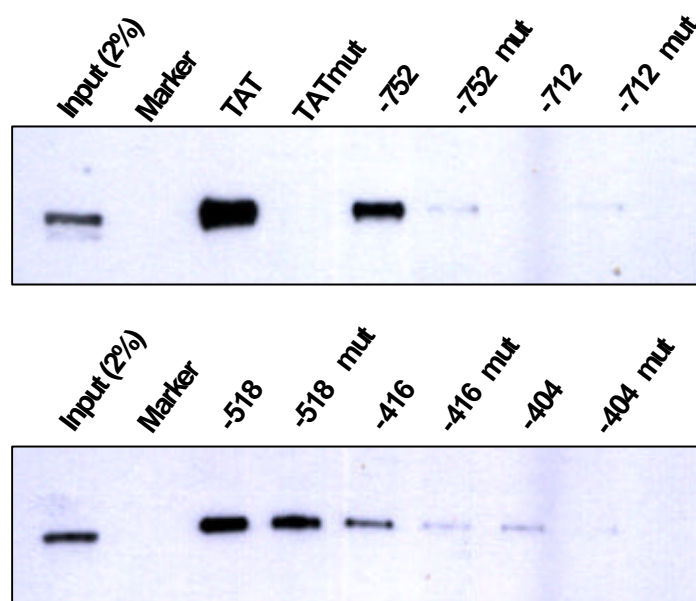


Abbildung 53: Der murine SOCS-3-Promotor: ABCD-Bindungstest

Der ABCD-Bindungstest wurde mit den in Abbildung 54 beschriebenen biotinylierten DNA-Oligos durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das Bindungselement des Tyrosin-Aminotransferase-Promotors (TAT), als Negativkontrolle das entsprechende mutierte TATmut-Element. Es wurde rekombinanter GR-Extrakt eingesetzt. GR wurde im Western Blot mit dem GRP20-Antikörper (Santa Cruz detektiert). Da positive GREs eine höhere Bindungsaffinität zu GR aufweisen als nGREs, wurde nur 50 % der TAT-Probe auf das SDS-Gel aufgetragen. Dieses Experiment wurde bisher nur einmal durchgeführt.

Abbildung 53 zeigt den zugehörigen ABCD-Bindungstest, der aus zeitlichen Gründen bisher nur einmal durchgeführt wurde. Auch wenn der ABCD-Bindungstest bei der Bestimmung der Affinität des GR zu verschiedenen DNA-Elementen erfahrungsgemäß sehr zuverlässig ist, bedarf dieses Experiment der Verifizierung. Die potenziellen Bindungselemente bei -752 und -518 binden den GR mit (für ein nGRE) hoher Affinität. Das Bindungselement bei -416 bp zeigt eine sehr niedrige Affinität (möglicherweise nicht signifikant), die Bindung bei -404 kann im Vergleich mit den Elementen SOCS-3-752 und SOCS-3-518 als unspezifischer Hintergrund betrachtet werden. Alle potenziellen nGREs wurden mutiert und ebenfalls im ABCD-Bindungstest untersucht. Mit einer Ausnahme ist keines der mutierten Elemente in der Lage, den GR zu binden. Erstaunlicherweise zeigt die Mutante SOCS-3-518mut eine Bindung von nahezu gleicher Intensität wie das unmutierte Element. Die Relevanz dieser Bindung muss nach der Wiederholung des Experiments überprüft werden.

Abbildung 54 zeigt die DNA-Sequenzen der potenziellen nGREs und die korrespondierenden mutierte Elemente im Vergleich mit dem GRE-Konsensus, dem TAT-Element und dem nGRE-Suchmuster. Die Elemente SOCS-3-752, SOCS-3-518 und SOCS-3-404 sind in Rich-

tung 3' → 5' dargestellt, da das Suchmuster in diesen Fällen auf dem komplementären DNA-Strang gefunden wurde.

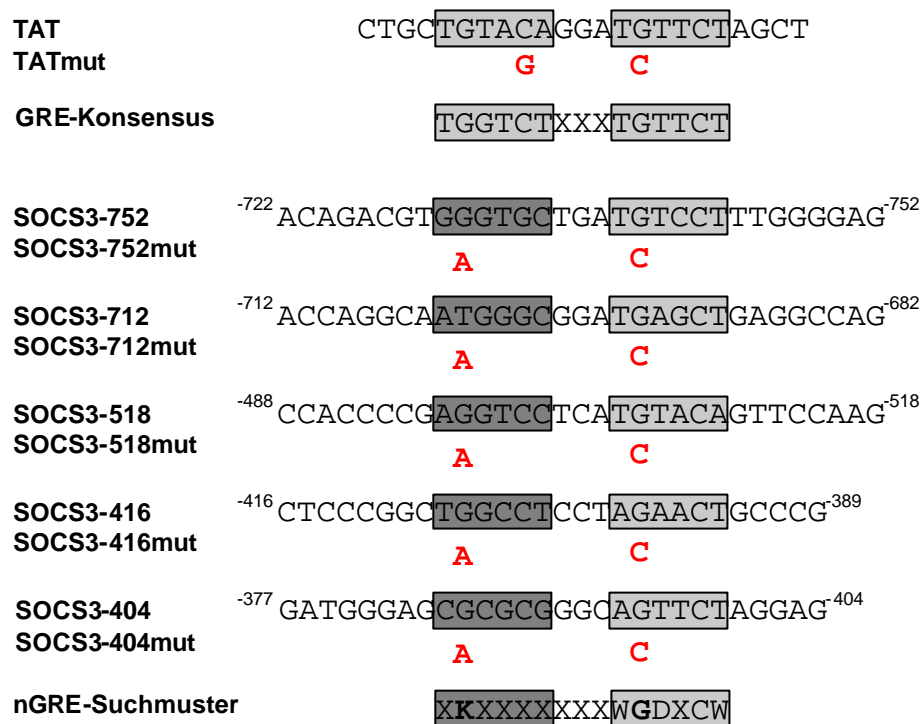


Abbildung 54: Die DNA-Sequenzen potenzieller nGREs und deren Mutation

Die Abbildung zeigt die eingesetzten DNA-Oligos und deren Mutation im Vergleich mit positiven GREs. Das TAT-Bindungsselement (oben) entspricht bis auf 1 bp dem GRE-Konsensus und wurde durch Mutation von zwei hochkonservierten Basenpaaren so verändert, dass es nicht mehr in der Lage ist, den GR zu binden (Negativkontrolle TATmut). Die *in silico* gefundenen nGREs des murinen SOCS-3-Promotors (-855 bis -273 bp) sind im Vergleich mit dem nGRE-Suchmuster dargestellt. Die konservierten Halbseiten sind hellgrau, die nicht konservierten Halbseiten dunkelgrau dargestellt. Die eingefügten Mutationen sind in rot dargestellt..

Die Arbeit vorgestellten neuen GR-Bindungsselemente des SOCS-3-Promotors müssen nach der Verifizierung des ABCD-Bindungstests auf ihre Relevanz im Kontext der Zelle hin überprüft werden. Dazu eignet sich (wie für den murinen FasL-Promotor von N. Novac durchgeführt) die Chromatin-Immunpräzipitation. Sie gibt Auskunft darüber, ob der GR in der Zelle an den entsprechenden Promotorabschnitt bindet. Durch Einbringen der im ABCD-Bindungstest analysierten Mutationen in das SOCS-3-Plasmid (gerichtete Mutagenese) kann man die potenziellen nGREs im Luciferase-Reportergentest überprüfen. So kann man ermitteln, ob Dexamethason trotz Mutation des potenziellen nGREs noch in der Lage ist, den SOCS-3-Promotor zu reprimieren.

4.10. Der GR-Antagonist RU486 auf nGREs

Der Antagonist des Progesteron-Rezeptors, RU486 (oder auch Mifepriston), ist ebenfalls ein Antagonist des Glucocorticoid-Rezeptors. Für positive GREs konnte gezeigt werden, dass der RU486-gebundene Glucocorticoid-Rezeptor durch die Rekrutierung des Korepressors N-CoR die Transkription reprimiert (vgl. (Schulz *et al.* 2002) bzw. die Co-Immünpräzipitation in Abbildung 29). In dem folgenden Experiment sollte ermittelt werden, ob die Bindung des Antagonisten bei nGREs im Gegensatz zu dem Agonisten Dexamethason zur Aktivierung oder Repression führt. Dazu wurden sowohl der FasL-Promotor als auch der POMC-Promotor analysiert. Es wurde die Repression nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason und mit RU486 miteinander verglichen.

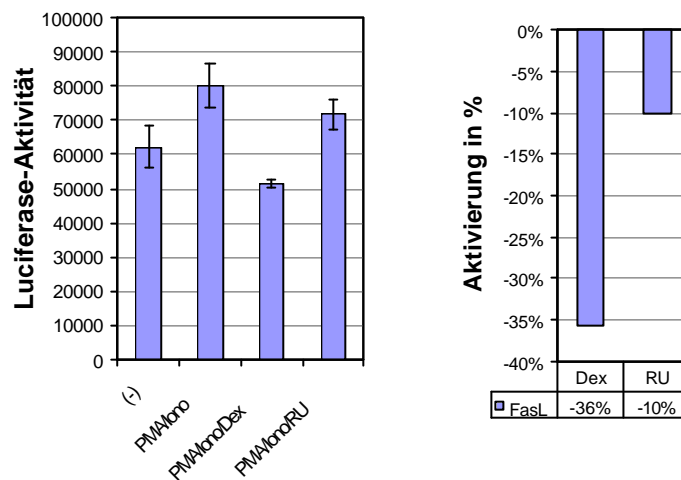


Abbildung 55: Der FasL-Promotor und RU486

Der Vektor mit dem humanen FasL-Promotor wurde in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit PMA/Ionomycin oder mit PMA/Ionomycin und Dexamethason oder RU486 behandelt. Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Tripletts. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason und RU486 in Prozent.

Wie Abbildung 55 und Abbildung 56 zeigen, reprimieren sowohl der Agonist Dexamethason, als auch der Antagonist RU486 jeweils die beiden Promotoren FasL und POMC. Jedoch ist die Repression von RU486 bei gleicher eingesetzter Konzentration (10^{-7} M) deutlich schwächer als die Repression durch Dexamethason. Es kommt durch RU486 jedoch nicht zu einer Umkehrung der Wirkung der DNA-Sequenz, nämlich dass der Antagonist auf einem nGRE eventuell zu einer Promotoraktivierung führen würde. Die Phenylamino-dimethyl-Gruppe des RU486-Moleküls (Abbildung 60) ragt aus der Ebene des Steroidgrundgerüsts heraus und induziert eine sterische Änderung der Ligandenbindungs-Domäne (LBD), die sich von der Agonisten-Konformation unterscheidet. Aufgrund der Strukturunterschiede der beiden GR-

Liganden kann man deshalb davon ausgehen, dass die Konformation des Antagonisten-gebundenen GR sich von der Konformation des Agonisten-gebundenen GR unterscheidet.

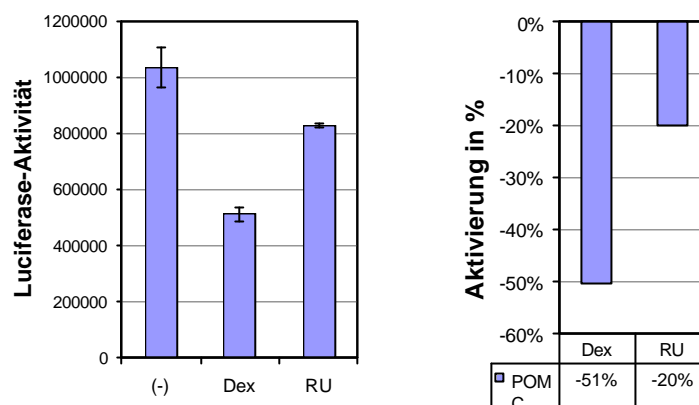


Abbildung 56: Der POMC-Promotor und RU486

Der Vektor mit dem humanen POMC-Promotor wurde in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason oder RU486 behandelt (im Vergleich gegen unbehandelte Zellen). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb dieses Triplets. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression durch Dexamethason und RU486 in Prozent.

4.11. Histondeacetylase-Inhibitoren

Histondeacetylasen sind in vielen Fällen in die Genrepression involviert. Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die Inhibition der Histondeacetylasen mit den HDAC-Inhibitoren Valproinsäure (VPA) und Trichostatin A (TSA) die Dexamethason-vermittelte Repression aufheben kann. Die beiden nGRE-enhaltenden Plasmide POMC und FasL wurden zusammen mit dem hGR-Plasmid in HepG2-Zellen transfiziert. Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen das Ergebnis in graphischer Darstellungsweise. Man kann erkennen, dass die Behandlung mit VPA die Repression bei beiden Promotor-Konstrukte aufhebt, während TSA, welches ein breiteres Spektrum an Histondeacetylasen inhibiert, sogar zu einer Promotoraktivierung führt. Für den HDAC-Inhibitor TSA wurde in der Literatur auch eine unspezifische Aktivierung von Promotoren beschrieben (Dressel *et al.* 2000). Die Ergebnisse zeigen, dass Histondeacetylasen auf den untersuchten Promotoren von Bedeutung sind und dass sie möglicherweise auch in der GR-vermittelten Repression eine Rolle spielen. Die Promotorfragmente von 600 (POMC) bzw. 1200 (FasL) bp Länge enthalten sehr viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, bei denen HDACs ebenso eine Rolle spielen könnten. Um die Rolle der Histondeacetylasen für die GR-vermittelte Repression eindeutig aufzuklären, bedarf es jedoch weiterer Experimente. Darauf wird in der Diskussion eingegangen.

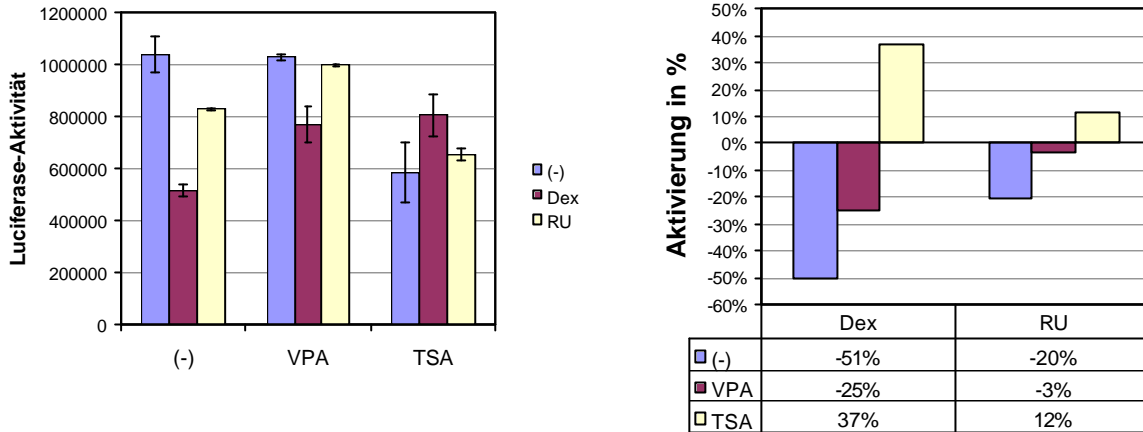


Abbildung 57: Der POMC-Promotor in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren

Das Plasmid des POMC-Promotors wurde zusammen mit dem hGR-Plasmid in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason, RU486 und den Histondeacetylase-Inhibitoren VPA und TSA behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung innerhalb dieses Tripletts. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression bzw. Aktivierung in Prozent.

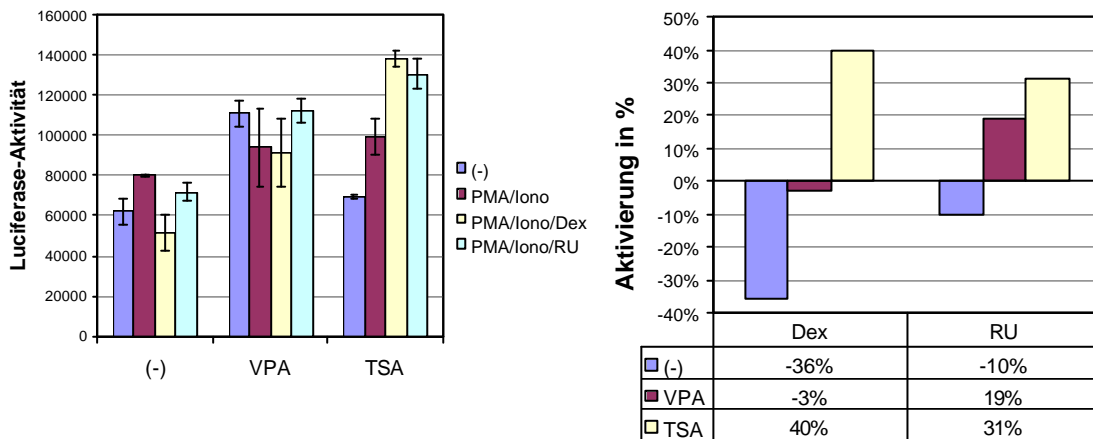


Abbildung 58: Der FasL-Promotor in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren

Das Plasmid des FasL-Promotors wurde zusammen mit dem hGR-Plasmid in HepG2-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin, Dexamethason, RU486 und den Histondeacetylase-Inhibitoren VPA und TSA behandelt (mit Ausnahme der Negativkontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen geerntet und der Luciferase-Reportergentest durchgeführt. Der Reportergentest wurde im Triplet durchgeföhrt, die eingefügten Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung innerhalb dieses Tripletts. Die Abbildung rechts zeigt die ermittelte Repression bzw. Aktivierung in Prozent.

5. Diskussion

5.1. Die Relevanz der nGREs für die Wirkung von Glucocorticoiden

Glucocorticoide (GCs) sind die wichtigste und am häufigsten eingesetzte anti-inflammatorische Substanzklasse. Die therapeutischen Effekte der Glucocorticoide werden seit mehr als 50 Jahren genutzt. 1985 wurde der zugehörige Rezeptor, der Glucocorticoid-Rezeptor kloniert (Weinberger *et al.* 1985). Die der GC-Wirkung zu Grunde liegenden Mechanismen werden erst seit den letzten 10-20 Jahren nach und nach aufgeklärt (Beato *et al.* 1995; Schäcke *et al.* 2002b).

Der Crosstalk zwischen dem Glucocorticoid-Rezeptor und AP-1 wurde vor etwas mehr als 10 Jahren entdeckt, der Crosstalk für NF- κ B 1997 (Liden *et al.* 1997). Die anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung der Glucocorticoide kommt durch Inhibierung der Synthese von Zytokinen, Chemokinen und durch die Repression von Genen verschiedener Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen zustande. Da diese Proteine und Peptide von AP-1 und NF- κ B aktiviert werden, geht man seit der Entdeckung der Trans-Repression davon aus, dass dieser Mechanismus für viele Effekte der GCs auf das Immunsystem verantwortlich ist (Jonat *et al.* 1990; Schüle *et al.* 1990) (Herrlich 2001).

Um die relevanten Unterschiede bereits in der Nomenklatur zu verdeutlichen (Tabelle 14), unterscheiden wir in Cis- (DNA-bindungsabhängig) und Trans- (keine GR-DNA-Bindung) Mechanismen (Dostert 2004). Abbildung 59 gibt einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen der Genmodulation durch den Glucocorticoid-Rezeptor.

Tabelle 14: Nomenklatur der verschiedenen Mechanismen des GR

Nomenklatur	GR-DNA-Bindung	Art der Modulation	Beispiel
Cis-Aktivierung	Ja	Aktivierung	Positives GRE , MMTV -Promotor
Cis-Repression	Ja	Repression	Negatives GRE, POMC-Promotor
Trans - Aktivierung	Nein	Aktivierung	STAT5, GR aktiviert synergistisch
Trans - Repression	Nein	Repression	NF- κ B, GR hebt die Aktivierung auf

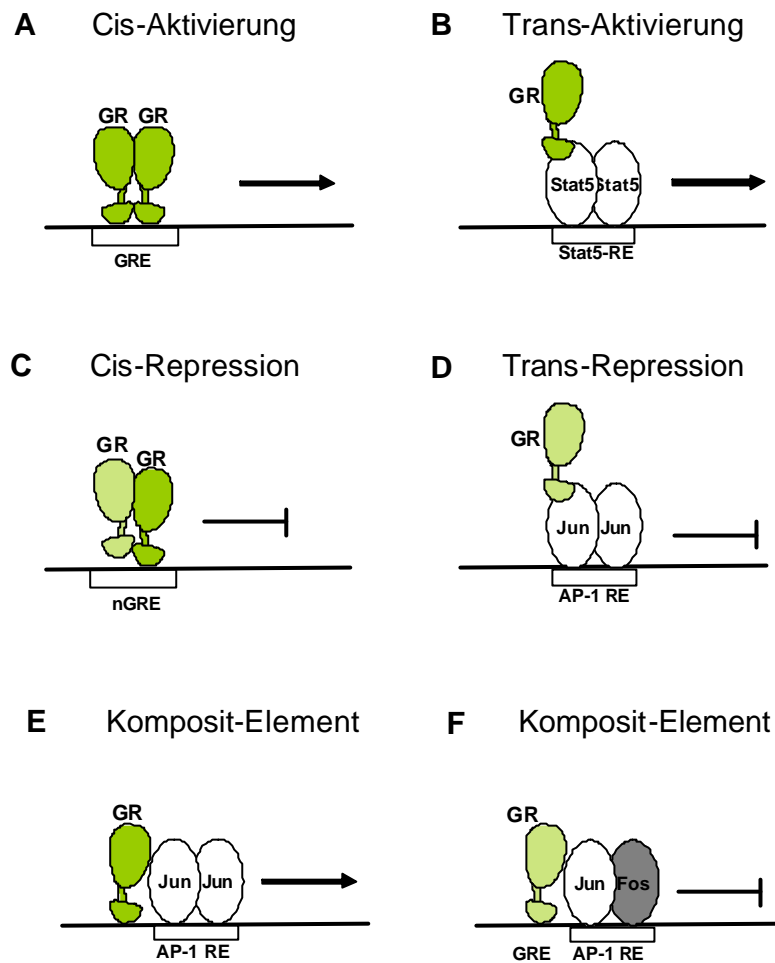


Abbildung 59: Mechanismen der Genmodulation durch den Glucocorticoid-Rezeptor

Der Glucocorticoid-Rezeptor moduliert die Aktivität seiner Zielgene über verschiedene Mechanismen. Bei positiven GREs (A) bindet der Rezeptor seine DNA-Konsensus-Sequenz als Homodimer (Cis-Aktivierung). Trans-Aktivierung tritt auf, wenn der Rezeptor ein STAT5-Homodimer direkt bindet und so die Gentranskription erhöht (B). Die sogenannten Komposit-Elemente stellen einen Spezialfall dar, bei dem GR direkt neben einer AP-1-Bindungsstelle an die DNA bindet und so die Genaktivität moduliert. Wenn ein Jun/Jun-Homodimer an das AP-1-Element gebunden ist, aktiviert GR die Genexpression (E), während im Falle eines Jun/Fos-Heterodimers die Transkription reprimiert wird (F). Für die nGRE-vermittelte Genrepression (C) werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Kapitel 5.4).

Durch die Entdeckung der Trans-Repression wurden die negativen GREs, über die bis zu diesem Zeitpunkt regelmässig neue Zielgene veröffentlicht wurden, aus dem Blickpunkt des Interesses gerückt (Tabelle 1, Seite 22). Nach wie vor ist die Anzahl der durch ein nGRE regulierten Gene deutlich niedriger als die Anzahl der Gene, die durch Interaktion des GR mit den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 reguliert werden (Barnes 1998; Dostert 2004). Es kommt erschwerend hinzu, dass die nGREs keine hochkonservierte Konsensussequenz aufweisen, und demzufolge nicht ohne Weiteres über eine DNA-Sequenzanalyse identifiziert werden können (Dostert und Heinzl 2002). Im Gegensatz zu der Vielzahl von Genen, wel-

che bekanntermaßen durch Trans-Repression reprimiert werden, sind somit für den Mechanismus der Cis-Repression nur einige wenige nGRE-enhaltenden Promotoren charakterisiert worden. nGRE-regulierte Gene spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase, wie z.B. die negative Regulation der Gene POMC und CRH zeigt (Reichardt *et al.* 1998).

Das Interesse an den positiven GREs bestand in erster Linie, weil sie für einige der Nebenwirkungen von Glucocorticoiden verantwortlich sind (Schäcke *et al.* 2002a). Unter den Genen, die von positiven GREs reguliert werden, befinden sich einige Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, wie die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), die Tyrosin-Aminotransferase (TAT), die Aspartat-Aminotransferase (AAT) und die Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) (Schäcke *et al.* 2002a). Diese Enzyme aktivieren die Gluconeogenese bei Stress und sind mitverantwortlich für die Induktion von Diabetes Mellitus bei der GC-Therapie.

Die Entdeckung, dass GR-Punktmutationen in der D-Schleife des ersten Zinkfingers zwischen Cis- und Trans-Modulation unterscheiden können, war ein wichtiger Schritt für die GR-Forschung (Heck *et al.* 1994). 1994 konnte von Heck *et al.* durch eine Punktmutation in der D-Schleife des ersten Zinkfingers gezeigt werden, dass die Repression der AP-1-Aktivität und die Transaktivierung (GREs) unterschiedlichen Mechanismen unterliegen und voneinander unterscheidbar sind.

Bis 1997 ging man davon aus, dass NF- κ B über einen anderen Mechanismus durch GCs reprimiert wird. Das Inhibitorprotein I- κ B α kann die Aktivierung und den Transport von NF- κ B in den Zellkern verhindern. Bei einer akuten Entzündung wird NF- κ B aktiviert und erhöht die Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen. Man nahm an, dass Glucocorticoide diesen Prozess über die Induktion von I- κ B α regulieren, indem I- κ B α dafür sorgt, dass NF- κ B in der inaktiven cytoplasmatischen Form bleibt (Cato und Wade 1996). Von Heck *et al.* konnte 1997 gezeigt werden, dass auch NF- κ B durch Trans-Repression reguliert wird. Durch die GR-Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion von I- κ B und die Inhibierung von NF- κ B zwei voneinander getrennte biochemische Prozesse darstellen. Denn die Dimerisierungs-defekte GR-Mutante ist nicht in der Lage, I- κ B zu aktivieren (Cis-Aktivierung), und kann trotzdem die NF- κ B-Aktivität reprimieren (Trans-Repression) (Heck *et al.* 1997).

Nachdem die 1995 hergestellten GR-Knockout-Mäuse embryonal lethal waren, wurde 1998 die von (Heck *et al.* 1994) vorgestellte Mutation in Mäuse eingefügt (Reichardt *et al.* 1998) (vgl. Kapitel 1.3.2). Die Beobachtung, dass diese Mäuse im Gegensatz zu den Knockout-Mäusen lebensfähig waren, hat Erstaunen ausgelöst und dafür gesorgt, dass sich das Interesse für die DNA-bindungsabhängigen Mechanismen weiter verringert hat, da sie ja offensichtlich nicht für die Lebensfähigkeit der Maus von Bedeutung waren.

Die Nebenwirkungen der Glucocorticoid-Therapie können bisher nur teilweise mit den bekannten GC-regulierten Zielgenen erklärt werden (Schäcke *et al.* 2002b). Die Mechanismen der GC-Nebenwirkungen sind komplex, verschiedenartig und nur teilweise verstanden. Neuere Daten gehen davon aus, dass einige der Nebenwirkungen wie Diabetes und das Glaukom hauptsächlich über den Mechanismus der Trans-Aktivierung (GRE) vermittelt werden, während andere über den Mechanismus der Trans-Repression laufen (z.B. die Suppression der HPA-Achse durch POMC und CRH). Für etliche Nebenwirkungen ist der genaue molekulare Mechanismus entweder noch unbekannt oder es scheint, dass auch die Trans-Repression involviert ist (z.B. bei der Osteoporose) (Schäcke *et al.* 2002b).

Die Pharmaindustrie ist bemüht, sich die Unterschiede der molekularen Mechanismen für die Entwicklung neuer sogenannter dissoziierter GR-Liganden zu Nutze zu machen. Diese Liganden induzieren präferenziell die Trans-Repression, ohne dabei die Cis-Repression und die Cis-Aktivierung zu beeinflussen (Schäcke *et al.* 2002a; Schäcke *et al.* 2002b). Dissoziierte Glucocorticoide trennen somit nach der gängigen Hypothese zwischen der anti-inflammatorischen Wirkung und (einigen) Nebenwirkungen. Ein günstigeres Profil zwischen Wirkung und Nebenwirkung könnte, neben den offensichtlichen Vorteilen gerade für chronisch kranke Patienten, auch die Analyse der molekularen Mechanismen vorantreiben. Einige der Nebenwirkungen (wie z.B. Osteoporose und Atrophie der Haut) werden nicht nur über einen einzelnen Mechanismus vermittelt, sondern durch komplexe Interaktionen reguliert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass nur ein Teil der unerwünschten Effekte durch neue Substanzklassen reduziert werden kann. Aufgrund der häufigen Anwendung von GCs in der Praxis würde jedoch auch ein reduziertes Nebenwirkungsspektrum den Patienten viele Vorteile bringen (Schäcke *et al.* 2002b).

5.2. Strategien zur Unterscheidung der verschiedenen GR-Repressionsmechanismen

In Kapitel 1.3.2 wurden die verschiedenen transgenen Mausmodelle für den Glucocorticoid-Rezeptor vorgestellt. Diese Mutanten haben sich als sehr hilfreich erwiesen, da mit deren Hilfe zwischen DNA-bindungsabhängigen und -unabhängigen Mechanismen unterschieden werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Luciferase-Reportergentest GR-exprimierende Plasmide mit den korrespondierenden humanen GR-Mutationen eingesetzt. Die Analyse von bereits charakterisierten Promotoren ergab, dass sich das System insbesondere eignet, um neue GR-Zielgene bezüglich des Mechanismus der Regulation zu charakterisieren. Microarray-Analysen von Günther Schütz und Peter Krammer (beide DKFZ) haben neben FasLigand und SOCS-3 weitere potenziell nGRE-regulierte Genkandidaten ergeben, die nach vorheriger Überprüfung ihrer Genregulation auf RNA- oder Proteinebene mit der hier etablierten Methode bezüglich des Repressions-Mechanismus analysiert werden

sollen. Des Weiteren kann der Luciferase-Reportergentest zur Analyse neuer dissoziierter GR-Liganden eingesetzt werden. Es erweist sich als deutlich schwieriger, klar zwischen Wirkung und Nebenwirkung unterscheidende GR-Liganden zu entwickeln, als zu Beginn vermutet wurde (Schäcke *et al.* 2002a; Schäcke *et al.* 2002b, persönliche Mitteilung Boehringer Ingelheim). Es werden wahrscheinlich keine universell einsetzbaren Substanzen, sondern lediglich Anwendungs-spezifische Medikamente entwickelt werden können (z.B. gegen rheumatoide Arthritis oder gegen Asthma bronchiale). Aufgrund der Komplexität der Regulation und der Vielzahl der GR-regulierten Gene muss dabei frühzeitig auf die Analyse von Tiermodellen zurückgegriffen werden. Es wäre sehr interessant, die in diesen Modellen analysierten Substanzen im Luciferase-Reportergentest auf ihre Aktivität zu untersuchen. Möglicherweise kann man Zusammenhänge zwischen einem bestimmten Mechanismus (z.B. der Cis-Repression) und einer im Tiermodell auftretenden Nebenwirkung ausmachen. Somit könnte der Luciferase-Reportergentest bei der Entwicklung weiterer GR-Liganden von der biochemischen/mechanistischen Seite her frühzeitig zusätzliche Anhaltspunkte über die zu erwartenden Wirkungen geben.

Zu den Limitierungen des Luciferase-Reportergentests zählt vor allem die bei der transienten Transfektion fehlende Chromatinstruktur. Um detaillierte mechanistische Analysen bezüglich Chromatin-modifizierender Systeme zu machen, ist der Reportergentest in seiner Anwendbarkeit nur eingeschränkt geeignet. Eine Alternative bietet die Arbeit mit endogenen Promotoren oder die Etablierung einer Zelllinie mit stabil integriertem Reporterplasmid.

5.3. Ligandenabhängige DNA-Bindung des GR

Der Glucocorticoid-Rezeptor aktiviert und reprimiert seine Zielgene abhängig von der Bindung eines entsprechenden Agonisten oder Antagonisten an seine Ligandenbindungs-Domäne. Es wurde überprüft, ob die Bindung des Rezeptors an die DNA und die Bindung von Kofaktoren im ABCD-Bindungstest ligandenabhängig sind oder nicht. Ein Ligandeneffekt wäre unter anderem auch für die Charakterisierung neuer GR-Agonisten mit verändertem Wirkungs-/Nebenwirkungsverhältnis von Interesse.

Die Verteilung der Nukleären Rezeptoren in den subzellulären Kompartimenten ist ein wichtiger Faktor für deren biologische Aktivität (Hager *et al.* 2000). In der Abwesenheit der jeweiligen Hormone befinden sich die Steroid-Rezeptoren gebunden in einem Komplex aus Chaperonen und Hitzeschockproteinen im Zytoplasma (Pratt 1992). Interaktion mit ihrem jeweiligen Ligand induziert eine Konformationsänderung und die Dissoziation vieler dieser assoziierten Faktoren. Man geht davon aus, dass diese Reorganisation der Steroidrezeptoren durch die vorher maskierten Translokationssignale (NLS) zustande kommt. Eine Ausnahme bildet der Estrogen-Rezeptor α , der konstitutiv im Nukleus lokalisiert ist (Htun *et al.* 1999).

Jedoch konnte in lebenden Zellen mittels hochauflösender Mikroskopie gezeigt werden, dass sich die ligandengebundenen GFP-ER-Fusionsproteine von einer gleichmässigen Verteilung in eine fokussierte punktierte Organisationsstruktur umverteilen. Diese punktierte Organisationsstruktur kann auch bei den anderen ligandengebundenen Nukleären Rezeptoren nach der Translokation in den Zellkern gefunden werden. Sie wurde für GR, PR, TR und auch für den der bHLH-PAS-Familie (basic helix-loop-helix, Per/Arnt/Sim) zugehörigen Ah-Rezeptor (Aryl Hydrocarbon Rezeptor) nachgewiesen (Hager *et al.* 2000). Auch wenn die Bedeutung dieser nukleären Strukturen noch nicht geklärt ist, so scheint sie doch eine wichtige Rolle für die Rezeptoraktivität zu spielen. Der Thyroid-Hormonrezeptor (TR) wurde als konstitutiv im Nukleus lokalisiert beschrieben (Hager *et al.* 2000). Von Zhu *et al.* wurde jedoch gezeigt, dass in der lebenden Zelle ein signifikanter Teil des TR auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Zhu *et al.* 1998). Die A-Form des Progesteron-Rezeptors ist in der Abwesenheit von Liganden hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, während die B-Form im Zytoplasma vorliegt (Lim *et al.* 1999). Auch GR β ist im Gegensatz zu GR α konstitutiv im Nukleus lokalisiert (Schaaf und Cidlowski 2002; Leung und Bloom 2003).

Man geht davon aus, dass die intrazelluläre Verteilung durch mehrere Mechanismen bestimmt wird. Neben den Nukleären Lokalisationssignalen (NLS) in den Rezeptoren und deren räumlicher Zugänglichkeit im Zytoplasma spielt auch die Bildung von makromolekularen Komplexen im Zellkern eine Rolle (Hager *et al.* 2000). Interessanterweise kann die punktierte Organisationsstruktur im Zellkern bei Bindung des entsprechenden Antagonisten nicht beobachtet werden. Dies konnte für GR (Htun *et al.* 1996) und MR (Fejes-Toth *et al.* 1998) gezeigt werden.

In der Zelle spielen die Kompartimente eine wichtige Rolle. Da der Ligand selbst wegen seiner lipophilen Eigenschaften alle Kompartimente ungehindert passieren kann, werden Ort, Menge und Konformation bzw. Zugänglichkeit des Glucocorticoid-Rezeptors genau reguliert. So befindet sich der Apo-GR im Zytoplasma in einem Proteinkomplex und die Translokation in den Zellkern findet erst nach der Ligandenbindung und der anschließenden Dissoziation des Komplexes statt. So wird der GR daran gehindert, überhaupt mit dem entsprechenden DNA-Element in Kontakt zu treten. Der Glucocorticoid-Rezeptor liegt in Abwesenheit seines Liganden zwar im Zytoplasma vor, jedoch konnte in Experimenten mit GFP-GR festgestellt werden, dass eine kleine Menge GR auch im Zellkern lokalisiert zu sein scheint (persönliche Mitteilungen, Keystone Meeting). Ob diese Beobachtung für den endogenen Glucocorticoid-Rezeptor eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht sicher. Da offensichtlich mehrere Mechanismen für die biologische Aktivität der Nukleären Rezeptoren von Bedeutung sind (Hsp-Komplex, Nukleäres Lokalisationssignal, nukleäre Lokalisation in Multiproteinkomplexen), lag die Frage nahe, ob sich die Bindungsaffinität des GR zu seinem DNA-Element in Abhängigkeit des gebundenen Liganden verändert. Im ABCD-Bindungstest konnte gezeigt werden,

dass GR unabhängig vom Ligandenbindungsstatus an das DNA-Element bindet. Diese Beobachtung konnte in einem in einem vergleichbaren *in vitro*-Experiment bestätigt werden (persönliche Mitteilung ChenKon Shih, Boehringer Ingelheim, Ridgefield).

Jedoch konnte in einigen Experimenten eine stärkere DNA-Bindung in Gegenwart des Agonisten beobachtet werden (TAT-Bindungselement, Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war unter den getesteten Bedingungen nicht reproduzierbar. Es konnte jedoch in keinem einzigen Experiment eine stärkere GR-Bindung in Abwesenheit des Liganden beobachtet werden. Möglicherweise hängt diese Beobachtung von der Stabilität des GR-Hitzeschock-Komplexes ab, dem *in vitro* bei fehlender Kompartimentstruktur sicher eine größere Bedeutung zukommt als in der intakten Zelle. Der GR kann *in vitro* bei erhöhter Temperatur (5 min 30°C) auch ohne Ligandenzugabe aktiviert werden (persönliche Mitteilung T. Heinzel und W. Schmid). Vermutlich führt die Temperaturerhöhung zur Instabilität des Hitzeschock-Komplexes. Jedoch stellt sich dann die Frage, welche Mechanismen die Stabilität des Komplexes in der Zelle bewirken. Denkbar wäre, dass hier ein indirekter Energie-abhängiger Mechanismus den Komplex bis zur Ligandenbindung in seiner stabilen Konformation hält.

Man kann die ligandenabhängige DNA-Bindung eines Transkriptionsfaktors in der Zelle mittels Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) nachweisen. Dabei werden die Zellen einige Stunden nach der Ligandenzugabe mit Formaldehyd fixiert, wobei die entstehenden kovalenten Vernetzungen dafür sorgen, dass die zu diesem Zeitpunkt bestehenden Proteinbindungen praktisch ‚eingefroren‘ werden. Anschließend präzipitiert man den entsprechenden Transkriptionsfaktor und weist die co-präzipitierte DNA mittels einer PCR-Reaktion mit Promotor-spezifischen Primern nach. Mit dieser Methode konnte die ligandenabhängige Bindung des GR auf dem FasL-nGRE bei -700 bp nachgewiesen werden (N. Novac, AG Heinzel). Dieses Ergebnis bedeutet, dass der GR im Nukleus von dem zweiten identifizierten potenziellen nGRE bei -500 bp ferngehalten wird. Da der aktivierte Promotor in einer offenen Chromatinstruktur vorliegt, könnte das potenzielle nGRE *in vivo* durch einen weiteren Transkriptionsfaktor oder durch Chromatin-assoziierte Proteine blockiert sein.

Die Gabe von Steroidhormonen bewirkt relativ schnell eine Änderung der Transkription. Man geht von einer Halbwertszeit von ca. 5-10 Minuten aus (Freeman und Yamamoto 2002). Auch die Entfernung des Hormons bewirkt ein rasches Abschalten der Aktivierung. Daraus resultiert die Frage, wie die transkriptionelle Aktivierung oder Repression von Steroid-Rezeptoren wieder ausgeschaltet werden kann. Bei einigen Faktoren konnte man zeigen, dass sie nach der Promotoraktivierung durch das Proteasom abgebaut werden. Bei den Nukleären Rezeptoren gibt es jedoch bisher keine Hinweise für diesen Regulationsmechanismus (Freeman und Yamamoto 2001; Freeman und Yamamoto 2002). Von Freeman et al. wurde vorgeschlagen, dass die regulatorischen Komplexe der Nukleären Rezeptoren aktiv und reversibel durch Chaperone zerlegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Cha-

peron p23, welches auch im Hitzeschock-Komplex mit GR zusammen im Zytoplasma vorliegt, ligandenabhängig an den untersuchten GR-Bindungselementen der Promotoren TAT und TO (Tryptophan-Oxygenase) mittels Chromatin-Immunpräzipitation detektiert werden konnte (Freeman und Yamamoto 2002). Auch das Hitzeschockprotein Hsp90 zeigte eine vergleichbare, wenn auch deutlich schwächere Aktivität. Das Hitzeschockprotein Hsp70, welches ebenfalls im zytoplasmatischen GR-Komplex vorliegt, konnte nicht nachgewiesen werden.

Im ABCD-Bindungstest ist die GR-DNA-Bindung langfristig stabil (mehrere Stunden). Man geht davon aus, dass der Mechanismus der Ablösung des GR von der DNA energieabhängig ist (Freeman und Yamamoto 2001). Interessanterweise bindet auch der GR^{dim} aus Gewebeextrakten der GR^{dim/dim}-Maus im ABCD-Bindungstest an DNA-Elemente mit GRE-Konsensus. Jedoch ist der GR^{dim}-DNA-Komplex deutlich instabiler als der GR^{wt}-DNA-Komplex und löst sich bei wiederholtem Waschen der Streptavidin-Sepharosematrix vom DNA-Element (persönliche Mitteilung T. Heinzel).

5.4. Die Konformationen des Glucocorticoid-Rezeptors

RU486 (Mifepriston) ist ein sehr aktives Antihormon, sowohl für den Progesteron-Rezeptor (PR) als auch für den Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Es bindet beide Rezeptoren mit hoher Affinität ($K_d < 10^{-9} \text{M}$). Die Phenylamino-dimethyl-Gruppe des RU486-Moleküls (Abbildung 60) interagiert mit einer spezifischen Region der Ligandenbindungstasche und induziert eine sterische Änderung der Ligandenbindungs-Domäne (LBD), welche sich von der Agonisten-Konformation unterscheidet. Da GR und PR vom Aufbau her sehr ähnlich sind, gibt es keine reine Anti-Progesteron-Verbindung. RU486 wird wegen der Anti-Progesteron-Wirkung als Abortivum eingesetzt. Die Anti-Glucocorticoid-Wirkung ist hierbei zwar nicht von Nutzen, schadet aber auch nicht, da das Medikament nur einmal gegeben wird und die Nebenwirkungen der Glucocorticoiden nur bei Langzeittherapie von Bedeutung sind. Auch der Androgen-Rezeptor (AR) zeigt eine, wenngleich auch sehr niedrige Affinität für RU486. Der mit dem GR eng verwandte Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) zeigt gar keine Affinität für RU486, genau wie auch der Östrogen-Rezeptor (ER) (Cadepond *et al.* 1997).

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass RU486 den GR-Komplex mit den Hitzeschockproteinen im Zytoplasma stabilisiert (Lefebvre *et al.* 1988). Diese Beobachtung von 1988 könnte unter Umständen zur Anti-Hormonwirkung beitragen, verhindert jedoch nicht die Translokation des RU486-gebundenen GR in den Nukleus.

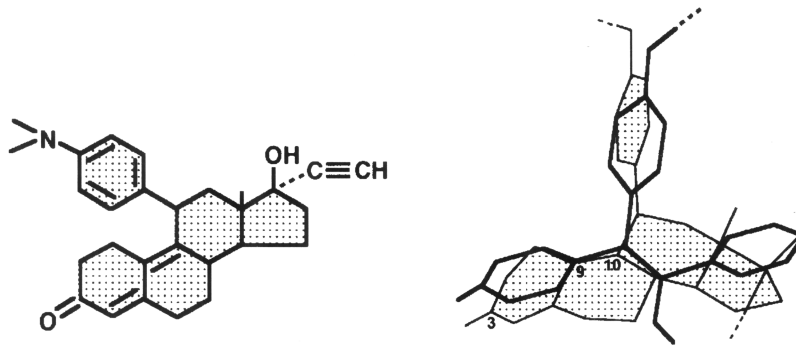


Abbildung 60: Strukturformel und dreidimensionale Ausrichtung von RU486

Die Phenylamino-dimethyl-Gruppe des RU486-Moleküls ragt aus der Ebene der Steroid-Grundstruktur heraus, interagiert mit einer spezifischen Region der Ligandenbindungstasche und induziert eine sterische Änderung der Ligandenbindungs-Domäne (LBD). Die Abbildung rechts zeigt die dreidimensionale Ausrichtung des RU486-Moleküls (hellgrau) im Vergleich mit dem Estrogen-Rezeptor (ER)-Antagonisten Tamoxifen (Cadepond *et al.* 1997).

RU486 verhindert das negative Feedback von endogenem Kortisol auf die Produktion und Sekretion von ACTH. Pharmakologisch kann bereits 1 mg Dexamethason den Effekt von 400 mg RU486 aufheben. Außerdem wurde gezeigt, dass RU486 auch eine partielle Agonistenaktivität auf den Glucocorticoid-Rezeptor hat (Schulz *et al.* 2002). Im Falle von nGREs konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Antagonist RU486 die Promotoren POMC und FasL reprimiert. Die Repression durch RU486 ist jedoch bei gleicher Konzentration schwächer als die durch Dexamethason verursachte Repression. Dies konnte sowohl für den POMC-Promotor, als auch für den FasL-Promotor gezeigt werden.

Nukleäre Rezeptoren können aufgrund ihrer modularen Domänenstruktur nicht als ganzes Protein strukturell aufgeklärt werden. Es wurden jedoch viele Kristallstrukturen der LBDs und DBDs verschiedener Nukleärer Rezeptoren aufgeklärt (vgl. Kapitel 1.2). Gerade die LBD-Struktur des Glucocorticoid-Rezeptors konnte wegen ihrer stark lipophilen Eigenschaften, und der daraus resultierenden technischen Schwierigkeiten lange nicht gelöst werden. Erst durch das Einfügen einer Punktmutation (F602S, Phenylalanin→Serin) wurden die Löslichkeitseigenschaften soweit verbessert, dass eine Kristallisierung möglich wurde (Bledsoe *et al.* 2002). Die GR-LBD weist als Besonderheit unter den Steroid-Rezeptoren eine anders geformte Liganden-Bindungstasche und ein anderes Dimerisierungs-Interface auf. Durch Aufklärung der Kristallstrukturen werden zwar wertvolle Hinweise gewonnen, jedoch kann die postulierte Wechselwirkung zwischen der DBD und LBD nicht untersucht werden.

Von Xu *et al.* wurde der tryptische Verdau des GR der Ratte eingesetzt, um die Konformationsunterschiede zwischen Liganden-gebundenem GR (Agonist und Antagonist) und Apo-GR nachzuweisen (Xu *et al.* 1999). Nur der Apo-GR zeigte in dem Experiment ein Fragment von 16 kDa, während die Ligandenbindung den Verdau an dieser Stelle verzögerte. Die Spaltungsstelle befindet sich an Position 651 (Arginin in Helix 6 der LBD).

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte partielle Proteaseverdau in Abhängigkeit des DNA-Bindungselementes wurde bereits für den Androgen-Rezeptor eingesetzt (Geserick *et al.* 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass der AR auf universellen Steroid-Rezeptor-DNA-Elementen eine andere Konformation einnimmt, als auf für den AR selektiven Bindungselementen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein vergleichbares Ergebnis für den Glucocorticoid-Rezeptor (GRE und nGRE) gezeigt werden.

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. Diese Untereinheiten können unabhängig voneinander agieren. Die modulare Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors wurde für den Aktivator GAL4 der Hefe am besten charakterisiert. GAL4 kontrolliert die Gentranskription von Genen, deren Produkte für den Galaktose-Metabolismus von Bedeutung sind. Das GAL4-Protein hat drei Funktionen: Es bindet einen DNA-Abschnitt in der UAS-Sequenz (upstream activating sequence), es aktiviert die Transkription, und bindet das regulatorische Protein GAL80 (GAL80 verhindert die GAL4-aktivierte Transkription). Man kann die GAL4-DBD gegen eine andere DBD austauschen, ohne dass das Protein seine anderen Funktionen verliert (Lewin 2000). Diese Beobachtung bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass es keinerlei intramolekularen Interaktionen im nativen Kontext der Proteine geben kann (Lefstin und Yamamoto 1998). Von Lefstin und Yamamoto wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem die DNA-Sequenz des Bindungselementes als allosterischer Modulator für den Transkriptionsfaktor wirkt und die Rezeptorkonformation ändert. (Lefstin und Yamamoto 1998). Nach dieser Hypothese enthält das GR-Bindungselement Informationen, die durch den gebundenen Transkriptionsfaktor interpretiert werden. Die allosterische Information würde demnach von der DNA-Sequenz über die DBD, die Scharnier-Region und die Helix 1 an die Ligandenbindungs-Domäne weitergegeben. Die LBD ändert ihre Konformation, rekrutiert die entsprechenden Kofaktoren und bewirkt damit eine veränderte Genexpression.

Für positive GREs weiß man, dass die Bildung des Homodimers punktsymmetrisch erfolgt. Jede Halbseite des GRE bindet ein GR-Molekül. Die beiden Proteine dimerisieren dann mittels Aminosäuren der D-Schleife (DBD) und der LBD. Die Bildung eines Homodimers ist nur bei DNA-Kontakt des GR möglich (Drouin *et al.* 1992). Für die negativen GREs mit nur einer konservierten Halbseite ist aufgrund der Experimente mit den GR^{dim}-Mutanten nachgewiesen, dass die Dimerisierungsfunktion der DBD für die Cis-Repression essenziell ist. Jedoch weiß man noch nicht, wie die beiden LBDs in diesem Fall zueinander orientiert sind, da sie durch die Scharnier-Region prinzipiell zur Rotation in der Lage sind (wie z.B. bei den asymmetrischen DR-Bindungselementen der heterodimerisierenden Rezeptoren, Kapitel 1.2).

Im Gegensatz zu GREs, deren Mechanismus relativ gut charakterisiert ist (Abbildung 61, A), existieren mehrere Modelle der Genrepression durch nGREs (B bis D). Für den Mechanismus der nGREs wurde eine Konformationsänderung (B) und die Bindung eines GR-Trimers

(C) vorgeschlagen. Die Tatsache, dass nur eine Halbseite in nGREs konserviert ist, führt zu der Vermutung, dass ein GR-Monomer für die Repression des Zielgens verantwortlich ist (vgl. Modell D). Auf der anderen Seite zeigt der Vergleich der Footprint-Daten von GREs und nGREs, dass eher ein GR-Dimer involviert ist.

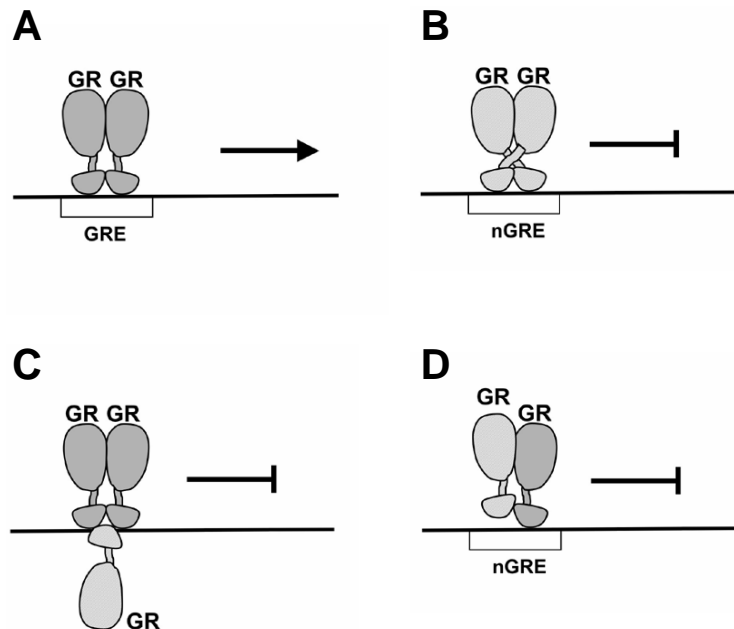


Abbildung 61: Modell der verschiedenen Bindungsmechanismen des GR

Der Glucocorticoid-Rezeptor bindet als Homodimer an positive GREs (A). Für negative GREs werden verschiedene Mechanismen diskutiert (B-D). Entweder bindet der GR als Homodimer mit einer anderen Konformation (B), oder ein drittes GR-Molekül bindet auf der dem Dimer gegenüberliegenden Seite (C, (Drouin *et al.* 1993). Bei der dritten Möglichkeit bindet der GR als Dimer, wobei aber nur ein Molekül Kontakt zur konservierten Halbseite des nGRE-Bindungselementes hat. Das zweite Molekül liegt durch den fehlenden DNA-Kontakt in einer repressiven Konformation vor. Der in reprimierender Konformation vorliegende Rezeptor ist hellgrau dargestellt. (Abbildung modifiziert nach (Dostert 2004))

Dieser offensichtliche Widerspruch könnte durch folgenden Mechanismus erklärt werden: GR bindet das DNA-Element als Dimer, wobei nur ein GR-Molekül direkten Kontakt zur DNA hat. Das andere Molekül befindet sich in einer Monomer-Konformation und interagiert nicht direkt mit der DNA, verhindert jedoch bei Footprint-Experimenten den Verdau der DNA durch das DNase I-Molekül (D). Der als Monomer an die DNA gebundene GR würde in einer anderen Konformation vorliegen, und so die Genexpression durch einen Mechanismus reprimieren, der Ähnlichkeit mit der Trans-Repression aufweist (Lefstin und Yamamoto 1998). Dieses Monomer könnte durch andere Transkriptionsfaktoren stabilisiert werden.

5.5. Kofaktoren des Glucocorticoid-Rezeptors

Der ABCD-Bindungstest wurde ursprünglich entwickelt, um die DNA-Bindung der Rezeptoren TR, RAR und RXR zu analysieren. Der Test wurde in diesem Zusammenhang erfolgreich

für die Detektion von Koaktivatoren und Korepressoren eingesetzt (Glass *et al.* 1988; Hörlein *et al.* 1995; Kamei *et al.* 1996). Zur Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA wird häufig ein sogenannter Bandshift (EMSA) durchgeführt. Dabei wird der Protein-DNA-Komplex in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die EMSA (electromobility shift assay)-Methode ist im Falle des Glucocorticoid-Rezeptors nicht zur Untersuchung von GR-DNA-Komplexen geeignet, da der GR keinen definierten Bandshift ergibt, solange kein Antikörper (Supershift) eingesetzt wird (persönliche Mitteilung T. Heinzel). Des Weiteren werden nur sehr kleine Mengen an GR-DNA-Komplex gebildet, welche keine ausreichende Ausgangsmenge für die Massenspektrometrie bilden. Der ABCD-Bindungstest weist als Affinitätsreinigung deutlich weniger Limitierungen und ein breitgefächertes Anwendungsspektrum auf. Im Gegensatz zum Exonuklease III-Test und zum DNase-Protektionstest können hier auch große PCR-Fragmente von 600 bis 1000 bp analysiert werden.

Unter der Vielzahl von Kofaktoren interagieren einige auch mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (Tabellen 15 und 16). GRIP-1 (GR interacting protein) z.B. wurde als Interaktionspartner des GR gefunden. PGC-1 ist ein leberspezifischer Kofaktor des Glucocorticoid-Rezeptors, der im Zusammenhang mit der Gluconeogenese von Bedeutung ist (Knutti *et al.* 2000; Herzig *et al.* 2001; Yoon *et al.* 2001). Andere Kofaktoren wie z.B. ARA70 wurden als Interaktionspartner anderer Steroid-Rezeptoren ermittelt (Yeh und Chang 1996). Kofaktoren interagieren praktisch immer mit mehreren Steroid-Rezeptoren und modulieren die Promotoraktivität je nach untersuchtem Kontext (Leung und Bloom 2003). Auch können sie sich teilweise gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen. Mittlerweile spricht man, statt von Aktivierung und Repression auch vom Konzept der Modulation, da einige der Faktoren in unterschiedlichen Zusammenhängen als Koaktivatoren oder als Korepressoren agieren. Der Korepressor RIP140 beispielsweise wurde zuerst als Koaktivator eingestuft (Subramaniam *et al.* 1999; Windahl *et al.* 1999). Für den Koaktivator GRIP-1 wurde ermittelt, dass er auch Korepressorfunktionen erfüllen kann (Rogatsky *et al.* 2001; Rogatsky *et al.* 2003). Kofaktoren werden je nach Zelltyp und untersuchtem Promotor in verschiedenen Proteinkomplexen gefunden. So konnte für die Korepressoren N-CoR und SMRT gezeigt werden, dass sie in unterschiedlichen Multiprotein-Komplexen enthalten sind, die überwiegend Histondeacetylaseaktivität aufweisen (Li *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte die ligandenabhängige Interaktion des GR mit dem Koaktivator SRC-1 gezeigt werden. Die Interaktion ist verglichen mit der Menge des eingesetzten TNT-translatierten SRC-1-Proteins (vgl. Input) eher schwach. Auch wenn diese Interaktion durch die Literatur bestätigt wird, so zeigt sich doch, dass GR offensichtlich den Kofaktor GRIP-1 zu bevorzugen scheint (Onate *et al.* 1995; Hong *et al.* 1997). Möglicherweise unterscheidet sich die Wahl des Kofaktors je nach Kontext (Promotor und Zelltyp). Unter Umstän-

den ersetzt SRC-1 GRIP-1 nur dann, wenn es im Überschuß vorhanden ist (wie in dem hier diskutierten Experiment). Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch die Tatsache, dass sich SRC-1 und GRIP-1, obwohl sie beide der Familie der p160-Proteine angehören, in ihren bisher publizierten Funktionen deutlich unterscheiden. Lediglich für SRC-1 wurde die Koaktivatorfunktion durch die intrinsischen Histonacetyl-Transferase (HAT) -Aktivität und die Rekrutierung weiterer HAT-Aktivität durch CBP/p300 nachgewiesen, während GRIP-1 sowohl als Koaktivator als auch als Korepressor (s.u.) beschrieben wurde (Yao *et al.* 1996).

Tabelle 15: Koaktivatoren des Glucocorticoid-Rezeptors

Name	Interaktion	Funktion	Referenz
SRC-1	Koaktivierung <i>in vivo</i>	Histonacetyltransferase	(Onate <i>et al.</i> 1995)
GRIP-1	Interaktion <i>in vitro</i> , Koaktivierung <i>in vivo</i> , auch Korepressorfunktion (vgl. unten)	Vermittelt Transkription über Histonacetyltransferasen	(Hong <i>et al.</i> 1997)
P/CAF	Interaktion <i>in vitro</i> , GR bindet GRIP-1 und interagiert dann mit P/CAF	Histonacetyltransferase	(Li <i>et al.</i> 2003)
CBP/p300	Interaktion <i>in vitro</i> , interagiert mit P/CAF und SRC-1	Histonacetyltransferase	(Yao <i>et al.</i> 1996)
ARA70	Interaktion <i>in vitro</i> , geringe Koaktivierung des GR <i>in vivo</i>	Starker Koaktivator für Androgen-Rezeptor	(Yeh und Chang 1996)
RAP46	Interaktion <i>in vitro</i>	Koaktivator	(Zeiner und Gehring 1995)
GRIP170	Koaktivierung <i>in vivo</i>	Koaktivator	(Eggert <i>et al.</i> 1995)
SW12/SNF2	Interaktion <i>in vitro</i> , Koaktivierung <i>in vivo</i>	Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes	(Muchardt und Yaniv 1993)
PGC-1	Interaktion <i>in vitro</i> , Koaktivierung <i>in vivo</i>	Relevant in der hepatischen Gluconeogenese	(Knutti <i>et al.</i> 2000; Yoon <i>et al.</i> 2001)
BRG-1-Komplex	Wird zur Aktivierung des MMTV-Promotors im Chromatin-Kontext benötigt	Chromatin-Remodeling-Komplex	(Fryer und Archer 1998)

(modifiziert und erweitert nach (Robyr *et al.* 2000))

Obwohl die GR-vermittelte Repression für die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden von großer Bedeutung ist, konnten bisher noch nicht viele Korepressoren und Korepressor-assoziierte Proteine für den GR charakterisiert werden. Der Collagenase 3A-Promotor wird durch GR über den Mechanismus der Trans-Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 reprimiert. GRIP-1 wirkt in diesem Zusammenhang als Korepressor (Rogatsky *et al.* 2001; Rogatsky *et al.* 2003). Bisher wurde nur eine Interaktion zwischen GR und einer Histondeacetylase beschrieben (Ito *et al.* 2000b). Nach Behandlung der Zellen mit IL-1 β und Dexamethason konnte in einer Co-Immünpräzipitation eine schwache Interaktion des GR mit HDAC2 festgestellt werden. Der Korepressor RIP140 interagiert außer mit GR auch mit anderen Steroid-Rezeptoren und dem Ah-Rezeptor (Aryl Hydrocarbon-Rezeptor). Es konnte gezeigt werden, dass RIP140 als eine Art Plattform wirkt, Histondeacetylase-Aktivität (HDAC1 und 3) und das C-terminale Bindungsprotein (CtBP) rekrutiert (Vogelstein *et al.* 2000; Wei *et al.* 2000; Wei *et al.* 2001). Für den nGRE-regulierten PRL-Promotor konnte im Luciferase-Reportergentest gezeigt werden, dass die GR-vermittelte Repression durch RIP140-Kotransfektion reduziert werden konnte. Außerdem reprimiert RIP140 die GR-induzierte Aktivierung auf positiven GREs (Subramaniam *et al.* 1999; Windahl *et al.* 1999). Calreticulin wird neben seiner Funktion als Kalziumlager-Protein im Lumen des endoplasmatischen Retikulums auch im Nukleus gefunden. Es interagiert mit der DNA-Bindungsdomäne von Nukleären Hormonrezeptoren und kann so den GR an der Interaktion mit seinem DNA-Bindungselement hindern (Burns *et al.* 1994).

Es konnte in unterschiedlichen Zusammenhängen gezeigt werden, dass GR mit Korepressoren wie N-CoR (Song *et al.* 2001; Schulz *et al.* 2002) und RIP140 (Subramaniam *et al.* 1999; Windahl *et al.* 1999) interagiert. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Hinweise für eine Beteiligung des Korepressors N-CoR bei der Cis-Repression gefunden. In wieweit sich diese Daten auf den Kontext der Zelle übertragen lassen, muss noch untersucht werden. Die Kotransfektion von N-CoR ergab eine leichte Verstärkung der Repression durch GCs für die Promotoren POMC und FasL. Die Aussagekraft dieses Experiments ist jedoch aufgrund des in HepG2 vorhandenen endogenen N-CoR-Proteins sehr begrenzt (Daten nicht gezeigt). Der Luciferase-Reportergentest könnte dann eingesetzt werden, wenn man ein Plasmid für eine N-CoR si-RNA kotransfiziert und so die N-CoR-Expression verhindert. Diese Experimente sind geplant und sollen demnächst durchgeführt werden. Eine zweite Möglichkeit stellt die bereits erwähnte Chromatin-Immünpräzipitation dar, mit der man den direkten Nachweis erbringen kann, ob N-CoR auf einem bestimmten DNA-Abschnitt des Promotors bindet.

Tabelle 16: Korepressoren des Glucocorticoid-Rezeptors

Name	Interaktion	Funktion	Referenz
N-CoR	Interaktion braucht den GR-N-Terminus und den C-Terminus und mehrere Domänen von N-CoR	Korepressor, in mehreren Multiproteinkomplexen u.a. mit HDAC-Aktivität assoziiert	(Song <i>et al.</i> 2001; Schulz <i>et al.</i> 2002)
RIP140	Die LBD des GR interagiert sowohl mit dem C-als auch mit dem N-Terminus von RIP140	Korepressor, rekrutiert HDAC1, HDAC3 und CtBP	(Subramaniam <i>et al.</i> 1999; Windahl <i>et al.</i> 1999)
Calreticulin	reprimiert Transkription durch Blockieren der GR-DBD	Kalziumlager-Protein, Repressor	(Burns <i>et al.</i> 1994; Dedhar <i>et al.</i> 1994)
GRIP-1	Als GR-interagierendes Protein <i>in vitro</i> , Aktivator oder Korepressor <i>in vivo</i>	Zuerst als Koaktivator gefunden, vermittelt je nach Kontext auch Repression	(Rogatsky <i>et al.</i> 2001; Rogatsky <i>et al.</i> 2003)
HDAC 2	Schwache Interaktion von GR und HDAC2	Histondeacetylase	(Ito <i>et al.</i> 2000b)

(modifiziert und erweitert nach (Robyr *et al.* 2000))

Der Korepressor N-CoR interagiert in Säugerzell-2-Hybrid-Bindungstests mit dem Glucocorticoid-Rezeptor sowohl in Agonisten-, als auch in Antagonisten-Konformation (Wang *et al.* 2004). Es wurde ein Luciferasekonstrukt mit einem positiven GRE eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl im ABCD-Bindungstest als auch in der Co-Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen GR und N-CoR nur in Gegenwart des Antagonisten RU486 festgestellt werden. Wang *et al.* setzen im Mammalian-2-Hybrid-Bindungstest ein Gal-Fusionsprotein der NCoR- und SMRT-RID (nuclear receptor interaction domain) ein. Obwohl das System im Kontext der Zelle arbeitet, sind die untersuchten Fusionsproteine artifiziell. Es könnte daher sein, dass der fehlende Teil von N-CoR die sterischen Gegebenheiten in der Art beeinflusst, dass GR und N-CoR unabhängig vom Ligandenbindungsstatus miteinander interagieren.

Interessanterweise konnte im Säugerzell-2-Hybrid-Bindungstest auch eine Interaktion des GR mit SMRT festgestellt werden (Wang *et al.* 2004). Mit dem Korepressor SMRT konnte in der vorliegenden Arbeit wegen schlechter Antikörperqualität keine Interaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann zu SMRT in der vorliegenden Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Tabelle 17: Massenspektrometrisch ermittelte GR-Kofaktoren

Name	Funktion	Referenz
Hsp90	Der zytoplasmatische GR-Hitzeschockkomplex enthält 2 Hsp90-Proteine; Hsp90 im Zellkern verstärkt den nukleären Export des GR	(Pratt 1992; Tago <i>et al.</i> 2004)
Hsp70	Der zytoplasmatische GR-Hitzeschockkomplex enthält ein Hsp70-Protein; Hsp70 im Zellkern wurde als notwendig für die Ablösung des GR von der DNA beschrieben.	(Freeman und Yamamoto 2002)
β -Tubulin	Die Tubuline der Zelle sind wichtige Stützproteine; Es wurde eine Interaktion von GR mit den Tubulinen beschrieben, möglicherweise wandert der Rezeptor nach der Ligandenbindung an den Tubulinen entlang in den Nukleus	(Akner <i>et al.</i> 1995)
DC12 Protein*	Zu DC12 sind außer der Klonierung noch keine Daten publiziert worden.	(Strausberg <i>et al.</i> 2002)
Tial 1 (TIAR)*	RNA-bindendes Protein, bindet AU-reiche regulatorische Sequenzen der TNF- α (tumor necrosis factor α) mRNA	(Gueydan <i>et al.</i> 1999; Szpirer <i>et al.</i> 1999; Aritake <i>et al.</i> 2004)
Histon H1d	Eine Isoform des H1-Linker-Histons	(Ohe <i>et al.</i> 1989)
40S Ribosomales Protein	Eines der zahlreichen Proteine der 40S-Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen, keine näheren Angaben	gi 3122811;(keine spezielle Publikation)

* Die Peptide für diese beiden Proteine wurden in der selben Proteinbande gefunden.

Der ABCD-Bindungstest ist in Verbindung mit dem Western Blot nicht zur Identifizierung neuer Interaktionspartner geeignet. Um Interaktionspartner des GR massenspektrometrisch zu ermitteln, wurde der GR mit einem auf dem ABCD-Bindungstest basierenden Verfahren aufgereinigt. Um die Qualität der Proteinaufreinigung zu optimieren, wurde mit der Oligo-Elution ein zusätzlicher Reinigungsschritt eingeführt. Dabei wird ein nicht-biotinyliertes GR-Bindungselement im 10-fachen Überschuss eingesetzt, um GR und assoziierte Proteine von der Streptavidin-Sepharosematrix zu eluieren. Die in der Massenspektrometrie ermittelten Proteine werden im folgenden Abschnitt kurz dargestellt.

Hsp 90 wurde neben seinen vielfältigen Funktionen in der Zelle als Komponente des zytosolischen GR-Komplexes beschrieben (Pratt 1992). Es wurde außerdem gezeigt, dass Hsp90 eine Rolle bei dem nukleären Export von GR spielt (Tago *et al.* 2004). Auch für Hsp70 wurde neben seiner Beteiligung am zytosolischen GR-Komplex eine Rolle im Zellkern beschrieben (Freeman und Yamamoto 2002). Man geht davon aus, dass es bei der Ablösung des GR von der DNA eine Rolle spielt. Freeman und Yamamoto konnten jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Hsp90-Proteins finden. β -Tubulin interagiert mit GR *in vitro* und es konnte außerdem gezeigt werden, dass GR mit Tubulin in der Zelle kolokalisiert (Akner *et al.* 1995). Das DC12 Protein wurde zusammen mit Tial 1 (TIAR) in einer Bande ermittelt. Die cDNA dieses Proteins wurde zwar bereits analysiert (zusammen mit 15000 anderen cDNAs), jedoch existieren zu diesem Protein noch keinerlei Daten (Strausberg *et al.* 2002). Tial 1 oder TIAR (TIA-1 related) bindet AU-reiche regulatorische Sequenzen der TNF- α (tumor necrosis factor α) mRNA (Gueydan *et al.* 1999; Szpirer *et al.* 1999; Aritake *et al.* 2004). Die Expression von TIAL1 korreliert mit einer schlechten Prognose bei Estrogen-Rezeptor (ER)-positivem Brustkrebs (Aritake *et al.* 2004). Histon H1d ist eine Isoform des H1 Linker-Histons, dass mit der Linker-DNA zwischen zwei Histon-Oktameren interagiert (Ohe *et al.* 1989). Das 40S Ribosomale Protein ist eines der vielen Proteine der 40S-Untereinheit der Ribosomen. Die 60S und 40S-Untereinheiten der eukaryontischen Ribosome enthalten zusammen 83 Proteine.

Die Affinitätsreinigung von Kofaktoren des Glucocorticoid-Rezeptors bringt einige technische Schwierigkeiten mit sich. So ist es wichtig, alle unspezifisch bindenden Proteine so weit als möglich zu eliminieren, ohne dabei die Stringenz derart zu erhöhen, dass die GR-Kofaktor-Komplexe zerstört werden. Die meisten der gefundenen Kofaktoren stehen in einer Beziehung zu GR. Man kann also davon ausgehen, dass sich mit der Methode spezifisch GR-interagierende Proteine präzipitieren und ermitteln lassen. Die Sequenzierung sehr dünner Proteinbanden war aus technischen Gründen leider nicht erfolgreich. Hier ist unter anderem die Kontamination mit Keratinen von Bedeutung, die neben der technischen Ausstattung oft die wichtigste Limitierung der Massenspektrometrie darstellt. Mittlerweile gibt es hochauflösende Massenspektrometer, welche alle eluierten Proteine auf einmal (d.h. ohne vorherige Auftrennung im SDS-Gel) analysieren (persönliche Mitteilung V. Papov, Ridgefield). Man könnte die in der ABDCE-Proteinaufreinigung eluierten Proteine nach tryptischem Verdau mit dieser Methode untersuchen, und unter den ermittelten Peptiden gezielt nach Sequenzen relevanter Kofaktoren suchen.

Die Hitzeschock-Proteine und Tubuline liegen in einer deutlich höheren Konzentration in der Zelle vor als die relevanten Koaktivatoren und Korepressoren. Dadurch verschiebt sich bei der Komplexbildung das Gleichgewicht zu Ungunsten der gesuchten Proteine. Man kann einen Teil der irrelevanten Proteine durch die Herstellung nukleärer Zellextrakte eliminieren.

Jedoch hat der Einsatz verschiedener nukleärer Extrakte bei den unterschiedlichsten getesteten Reaktionsbedingungen immer zu massiver Bindung unspezifischer Proteine geführt (Daten nicht gezeigt), so dass es sinnvoller erschien, mit Ganzzellextrakten zu arbeiten.

HDACs befinden sich *in vivo* in Multiproteinkomplexen. Sie können ihre reprimierende katalytische Funktion über eine direkte oder indirekte Assoziation mit transkriptionellen Korepressoren, oder durch direkte Bindung an Transkriptionsfaktoren ausüben (Alland *et al.* 1997; Glass *et al.* 1997; Hassig *et al.* 1997; Heinzl *et al.* 1997; Laherty *et al.* 1997; Nagy *et al.* 1997; Huang *et al.* 2000; Kao *et al.* 2000).

Zu den Transkriptionsfaktoren, die zumindest indirekt mit HDACs interagieren zählen neben Nukleären Rezeptoren beispielsweise Mad-Max (Ayer *et al.* 1995; Laherty *et al.* 1997; Eilers *et al.* 1999) Rel A (p65 von NF- κ B) (Ashburner *et al.* 2001; Kiernan *et al.* 2003), Sp1 und Sp3 (Sun *et al.* 2002; Won *et al.* 2002; Zhang und Dufau 2002). Für den Glucocorticoid-Rezeptor wurde bisher jedoch nur eine schwache Interaktion mit HDAC2 publiziert (Ito *et al.* 2000a).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Histondeacetylase-Inhibitoren die GC-vermittelte Repression der Promotoren POMC und FasL aufheben. Da HDACs bei etlichen Transkriptionsfaktoren regulierend eingreifen, und die untersuchten Promotoren neben GR eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren binden, kann aus diesem Ergebnis nicht auf den Mechanismus der GC-vermittelten Repression geschlossen werden. Für den HDAC-Inhibitor TSA (Trichostatin A) wurde eine unspezifische Aktivierung von Promotoren beschrieben (Dressel *et al.* 2000). Um zu untersuchen, ob HDACs für die GC-vermittelte Repression verantwortlich sind, wäre eine Untersuchung in einem artifiziiellern System notwendig. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, kurze GR-Bindungselemente in einen SV40-aktivierten Luciferasevektor zu klonieren, und gezielt die Repression dieser Elemente zu analysieren. Solche Konstrukte wurden beispielsweise für das nGRE des POMC-Promotors kloniert. Diese Reporterplasmide reagieren jedoch nicht auf Glucocorticoide (persönliche Mitteilung N. Novac, AG Heinzl). Auch in der Literatur wurden keine derartigen Ergebnisse beschrieben. Dies spricht möglicherweise für einen Verdrängungsmechanismus, bei dem der ligandengebundene GR durch seine Bindung an das nGRE aktivierende Transkriptionsfaktoren verdrängt. Eine andere Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, dass nGREs im Luciferase-Reportergentest lediglich eine Repression von ca. 30-40% verursachen: Möglicherweise bewirken nGREs keine stark einschneidenden Veränderungen in der Transkriptionsregulation, sondern sorgen für eine Art Feinregulation der Transkription bei hohen GC-Konzentrationen. Dieser Mechanismus ist möglicherweise nicht stark genug, um den SV40-Promotor in seiner Aktivität zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang wird ebenfalls diskutiert, ob nicht mehrere GR-Bindungselemente oder die Interaktion des GR mit anderen Faktoren für die Repression benötigt werden (Lefstin und Yamamoto 1998; Dostert

2004).

5.6. Mögliche Mechanismen der GR-Genregulation

Für die DNA-abhängige Repression des Glucocorticoid-Rezeptors wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Mechanismen Promotor-spezifisch sind. Dabei ist es denkbar, dass der nicht-konservierte Teil des nGREs, der in Footprint-Experimenten geschützt ist, den Mechanismus bestimmt. Bei dem Osteocalcin-Promotor überlappt das nGRE die TATA-Box und inhibiert höchstwahrscheinlich die Formation des Transkriptionsinitiations-Komplexes. Bei dem POMC-Promotor überlappt das nGRE ein Bindungselement für den positiv agierenden Transkriptionsfaktor Nur77. Die Variabilität der nGREs könnte bedeuten, dass je nach Sequenz ein anderer Mechanismus abläuft. Dabei könnten Zelltyp-spezifische Faktoren eine Rolle spielen.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die GC-vermittelte Cis-Repression erst bei deutlich höheren Konzentrationen einsetzt als die GC-vermittelte Aktivierung des MMTV-Promotors. Beim MMTV-Promotor sind bereits kleinste Steroidmengen (FCS) ausreichend, die bei nGRE-regulierten Promotoren keine Reaktion zeigen. Die Sequenz der GR-Bindungselemente könnte durch die Bindungsaffinität bestimmen, bei welchen GC-Konzentrationen der Promotor auf die Glucocorticoide reagiert. Für den POMC- und den CRH-Promotor macht die Regulation der HPA-Achse bei höheren GC-Konzentrationen durchaus Sinn, weil eine bestimmte Menge an Glucocorticoiden im Blutstrom benötigt wird. Wenn die beiden Promotoren bereits bei sehr geringen GC-Konzentrationen aktiv würden (wie die positiven GREs), dann wäre die verbleibende GC-Menge möglicherweise zu niedrig, um die Gluconeogenese zu regulieren.

Denkbar wäre auch ein zweistufiger Regulationsmechanismus, der die Promotoraktivität zuerst über sterischen Ausschluss herunter reguliert (schnelle Reaktion), und bei anhaltend hoher GC-Konzentration mittels Rekrutierung von Kofaktoren die Histoneschwänze modifiziert und damit zu einer nachhaltigen Beeinflussung der Promotoraktivität führt.

5.7. Neue nGRE-regulierte Zielgene

Die Microarray-Technologie spielt bei der umfangreichen Charakterisierung neuer Zielgene des GR eine wichtige Rolle. GC-regulierte Gene wurden bisher in Eosinophilen (Chauhan *et al.* 2002), in T-Zellen (Franchimont *et al.* 2002; Galon *et al.* 2002), in Typ II Lungenepithelzellen (Gonzales *et al.* 2002), in Venen-Endothelzellen der Nabelschnur (McCormick *et al.* 2001), in prä-B-Leukämie-Zellen (Planey *et al.* 2003), in Leukämie-Zellen (Tonko *et al.* 2001), und in humanen Brustkrebs-Zellen (Wan und Nordeen 2002) analysiert. Diese Analysen erlauben keine Aussage über den Mechanismus der GR-vermittelten Genregulation.

Das nGRE im IL-1 β -Promotor macht bereits deutlich, dass die nGRE-vermittelte Repression auch bei der Regulation inflammatorischer Zielgene eine Rolle spielen kann (Zhang *et al.* 1997). Um zwischen Trans- und Cis-Modulation unterscheiden zu können, wurden im Labor von Günther Schütz vergleichende Microarray-Studien zwischen GR^{wt}- und GR^{dim/dim}-Mäusen durchgeführt. Die Analyse von Thymozyten-mRNA ergab einige Genkandidaten, die in der Immunmodulation eine Rolle spielen (persönliche Mitteilung W. Schmid, DKFZ). Einer dieser Kandidaten ist das SOCS-3-Gen. Die Rolle des SOCS-3-Proteins für die Regulation der HPA-Achse und die Repression des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges wurde bereits in der Einleitung (Kapitel 1.8.3) ausführlich beschrieben.

Auch beim FasLiganden-Promotor ergab die Analyse der GR^{dim/dim}-Mäuse, dass der Promotor durch den Mechanismus der Cis-Repression reguliert wird (persönliche Mitteilung S. Baumann, Labor von Peter Krammer, DKFZ). Indirekte Mechanismen über die DNA-abhängige Regulation anderer Proteine konnten ausgeschlossen werden (S. Baumann).

5.7.1. FasLigand

Glucocorticoide können den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) durch Repression des FasLiganden verhindern (Yang *et al.* 1995; Cui *et al.* 1996). Zum Mechanismus der Repression lagen bisher noch keine publizierten Daten vor. Durch vergleichende Analyse von GR^{wt}- und GR^{dim/dim}-Mäusen konnte ein Hinweis für die GC-vermittelte Cis-Repression des murinen FasL-Gens erhalten werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hinweis in Luciferase-Reportergentests für den humanen FasL bestätigt. Des Weiteren wurde die Lage der potenziellen nGREs in dem murinen FasL-Promotor bestimmt. Wie Ergebnisse des ABCD-Bindungstests zeigen, gibt es drei Bindungselemente, die den GR *in vitro* binden. Eine innerhalb der Arbeitsgruppe (N. Novac) durchgeführte Chromatin-Immunpräzipitation konnte zeigen, dass in der Zelle sowohl das DNA-Element bei -700 als auch das DNA-Element bei +135 durch GR gebunden wird. Leider sind der humane und der murine FasL-Promotor nur im proximalen Bereich (von ca. -300 bis +1) konserviert. Die für den murinen Promotor ermittelten GR-Bindungselemente konnten im humanen Promotor nicht gefunden werden. Da der humane und der murine Promotor jedoch funktionell konserviert sind, wird der humane Promotor derzeit nach dem hier etablierten Verfahren analysiert.

Abbildung 62 gibt einen Überblick über die bereits charakterisierten Bindungselemente des humanen FasL-Promotors. Die entsprechenden Referenzen und Bindungssequenzen werden im zitierten Übersichtsartikel (Li-Weber und Krammer 2003) detailliert beschrieben.

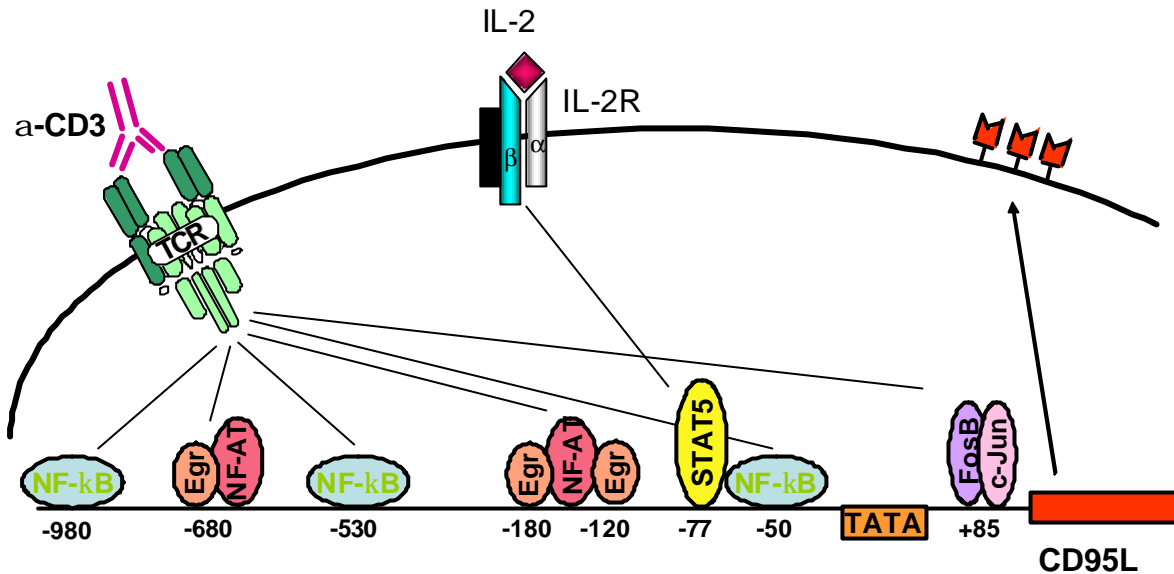


Abbildung 62: Bindungselemente des humanen FasL (CD95L)-Promotors

Für den humanen FasL-Promotor sind eine Vielzahl verschiedener Bindungselemente charakterisiert worden. Diese Bindungselemente sind über Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) z.B. durch einen α CD3-Antikörper aktivierbar. Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors kann pharmakologisch durch PMA (aktiviert Proteinkinase C) und Ionomycin (aktiviert den Ca_{2+} -Calicneurin-NFAT Signaltransduktionsweg) simuliert werden (nicht dargestellt). STAT5 wird durch Interleukin 2 (IL-2) aktiviert. (Li-Weber und Kramer 2003 und enthaltene Referenzen, Abbildung: S. Baumann)

Für den FasL-Promotor wurden viele Bindungselemente charakterisiert, die der GR-Trans-Repression unterliegen müssten: drei Bindungsstellen für NF- κ B, zwei für NF-AT, eine weitere für AP-1 (FosB/c-Jun-Heterodimer) und eine Bindungsstelle für STAT5 (Trans-Aktivierung). Jedoch kann die Trans-Repression durch Experimente mit GR^{dim/dim}-Mäusen von S. Baumann ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit für den humanen FasL-Promotor bestätigt.

Auf die Frage, warum GR hier nicht über Trans-Repression agiert, kann derzeit keine durch die Literatur unterstützte Aussage getroffen werden. Denkbar ist, dass die Transkriptionsfaktoren in diesem Kontext durch Koaktivator-Komplexe besetzt und somit für den GR nicht zugänglich sind. Die Analyse der DNA-Sequenz in unmittelbarer Umgebung der nGREs ergab keine relevanten Transkriptionsfaktoren, die der GR potenziell durch sterischen Ausschluss hemmen könnte (Prestridge 1991). In diesem Zusammenhang erscheint die Rekrutierung von Korepressor- und HDAC-Aktivität zur Repression des FasL-Promotors plausibler.

5.7.2. SOCS-3

Bei der Ratte konnte gezeigt werden, dass SOCS-3 durch Glucocorticoide reprimiert wird (Tollet-Egnell *et al.* 1999; Paul *et al.* 2000; Madiehe *et al.* 2001). Zu anderen Spezies sowie zum Mechanismus der Repression lagen bisher keine publizierten Daten vor. Durch Microar-

ray-Daten aus dem Labor von Günther Schütz konnte erstmals ein Hinweis für die GC-vermittelte Cis-Repression des murinen SOCS-3 erhalten werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hinweis mit Luciferase-Reportergentests bestätigt und die Lage des potenziellen nGREs auf einen Bereich von ca. 600 bp eingegrenzt (-855 bis -273). Wie vorläufige Ergebnisse des ABCD-Bindungstests zeigen, gibt es in diesem Abschnitt des Promotors zwei Elemente, die den GR *in vitro* binden. Ein weiteres Element bindet mit sehr niedriger Affinität. Die Analyse der DNA-Sequenz in unmittelbarer Umgebung der nGREs ergab keine relevanten Transkriptionsfaktoren, die der GR potenziell durch sterischen Ausschluss hemmen könnte (Prestridge 1991). Leider sind der humane und der murine SOCS-3-Promotor praktisch nicht konserviert (Daten nicht gezeigt). Deshalb müssen für den humanen SOCS-3-Promotor vergleichbare Analysen durchgeführt werden. Diese Experimente werden demnächst in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

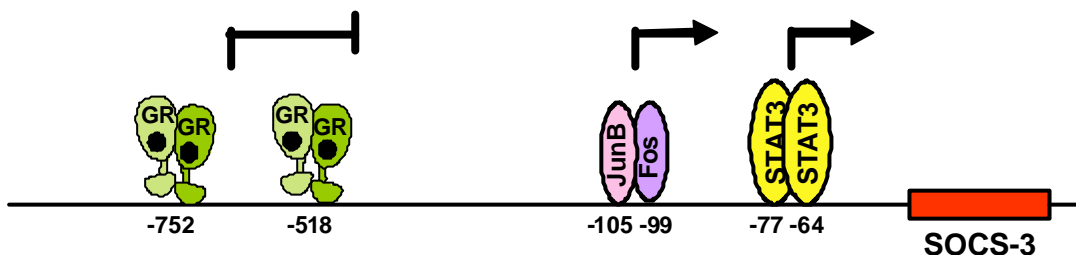


Abbildung 63: Schematische Darstellung des murinen SOCS-3-Promotors

Der murine SOCS-3-Promotor enthält ein AP-1-Bindungs-element (JunB/Fos) und ein STAT3-Bindungs-element, die beide den Promotor aktivieren. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten potenziellen nGREs binden den Glucocorticoid-Rezeptor und reprimieren den SOCS-3-Promotor (Cis-Repression).

Der murine SOCS-3-Promotor enthält ein Bindungs-element für AP-1 (JunB/Fos) und ein Bindungs-element für STAT3 (Abbildung 63). In der Abbildung sind die beiden im ABCD-Bindungstest ermittelten potenziellen nGREs eingezeichnet. SOCS-3 wird neben LIF (leukemia inhibitory factor) auch von anderen gp130-stimulierenden Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-11, Leptin, GH (growth hormone) und Prolaktin über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg aktiviert (Auernhammer *et al.* 1999). Dieser Effekt ist aufgrund des schnellen proteosomalen Verbaus des SOCS-3-Proteins von kurzer Dauer. Durch die Aktivierung von SOCS-3 wird die Wirkung der Zytokine in einem Rückkopplungsmechanismus kurzfristig aufgehoben.

In korticotropen Zellen wird sowohl SOCS-3, als auch POMC durch CRH (corticotropin releasing hormone) und LIF aktiviert (Abbildung 64). Interessanterweise werden beide Promotoren auch über Cis-Repression von Glucocorticoiden reguliert. SOCS-3 reprimiert nun den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, und verhindert in einer Rückkopplung die LIF-induzierte Aktivierung beider Promotoren.

Wenn -wie man bisher annahm- nur der POMC-Promotor ein nGRE enthielte, dann würde dieser durch GCs reprimiert, während SOCS-3 gleichzeitig die POMC-Promotoraktivierung von LIF unterbinden würde. Da jedoch beide Promotoren über ein nGRE reprimiert werden, bleibt die Information des LIF damit erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Genregulation sehr vielschichtig ist, und das durch die zahlreichen involvierten Faktoren eine Integration von vieler verschiedener Informationen (hier z.B. Dex, CRH und LIF) zustande kommt.

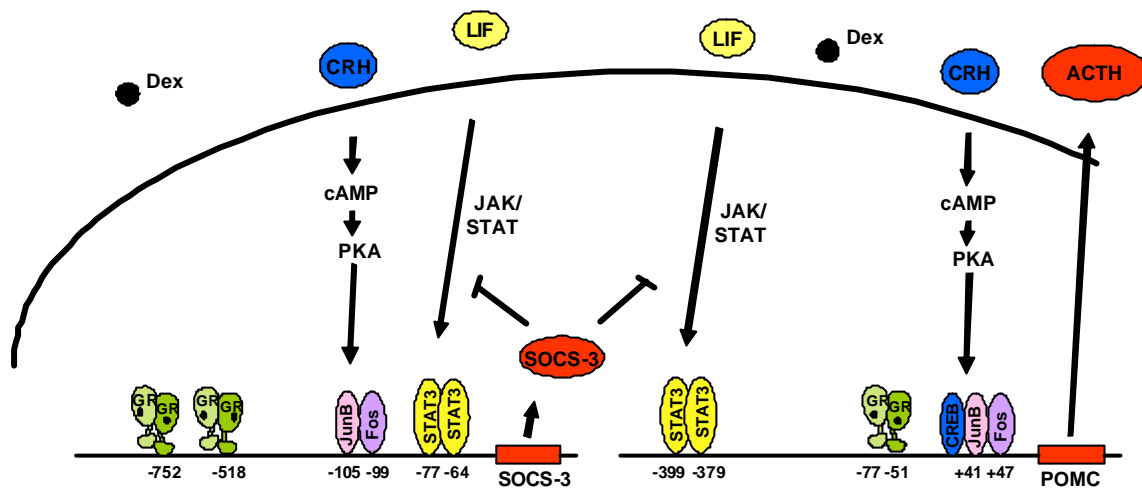


Abbildung 64: Modell der Regulation corticotropher Zellen

Sowohl POMC als auch SOCS-3 werden in corticotropen Zellen durch Dexamethason, CRH und LIF reguliert. Die Identifizierung des nGRE im SOCS-3-Promotor müsste sich danach auf die Signaltransduktion von LIF auswirken. Da SOCS-3 von Dex reprimiert wird, wird gleichzeitig die Blockade des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges durch SOCS-3 aufgelöst. (Abbildung modifiziert und ergänzt nach Auernhammer und Melmed 2001)

5.7.3. Die Bedeutung der neu charakterisierten Cis-reprimierten Zielgene

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Ermittlung neuer negativer Bindungselemente des GR ein Hinweis dafür erbracht werden, dass negative GREs auch im Kontext der Immunmodulation eine Rolle spielen. Bisher war nur für den Promotor des Interleukin 1 β -Gens ein negatives GR-Bindungselement beschrieben.

Es ist seit 1995 bekannt, dass Glucocorticoide und auch Retinsäure AICD durch Repression von FasLigand verhindern können (Yang *et al.* 1995; Cui *et al.* 1996). Während Dexamethason auf der einen Seite Apoptose in T-Zellen induziert, verhindert es interessanterweise den Aktivierungs-induzierten Zelltod AICD. Ob der Glucocorticoid-Rezeptor FasLigand über den Mechanismus der Cis- oder der Trans-repression reguliert, war bisher noch nicht publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein negatives Bindungselement des GR (nGRE) die Repression vermittelt (Baumann, Dostert *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Zu den nGRE-regulierten Genen, die bislang von größerem Interesse waren, gehören POMC und CRH, die beide in die Regulation der HPA-Achse involviert sind. Mit dem SOCS-3-Gen konnte in der vorliegenden Arbeit ein weiteres nGRE-reguliertes Gen identifiziert werden, das ebenfalls für die Regulation der HPA-Achse von Bedeutung ist.

Von Seki et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression von SOCS-3 in den peripheren T-Zellen von Patienten mit Typ T_H2 -Erkrankungen wie atopisches Asthma und Dermatitis eng mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Seki et al. 2003). Je schwerer der Krankheitsverlauf, desto höher war die Expression von SOCS-3 in den T-Zellen. Die Repression von SOCS-3 durch Glucocorticoide könnte somit eine wichtige Bedeutung für die Therapie dieser Erkrankungen haben.

Die Entwicklung dissoziierter GR-Liganden konzentriert sich bisher in erster Linie auf die Trans-reprimierten Zielgene des Glucocorticoid-Rezeptors. Die hier vorliegende Arbeit erbringt Hinweise, dass auch die DNA-abhängige Cis-Regulation für die Wirkung von Glucocorticoiden in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung sein könnte. Das könnte bedeuten, dass die sich derzeit in der Entwicklung befindenden Liganden nicht uneingeschränkt wirksam sind, und möglicherweise wichtige Aspekte der GC-Wirkung fehlen. Es bleibt herauszufinden, ob weitere nGRE-regulierte Zielgene in die Immunmodulation involviert sind und ob diese Gene pharmakologisch von Relevanz sind.

6. Ausblick

Die Nukleären Hormon-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Homöostase des Körpers. Hormone sind (außer dem zentralen Nervensystem) der wichtigste Weg, über den das Gehirn (Hypothalamus und Hypophyse) auf die Vorgänge des Körpers Einfluss nehmen kann. Es kommt hinzu, dass diese Signaltransduktionswege pharmakologisch leicht zu beeinflussen sind. Jedoch ist die Wirkung der einzelnen Hormone ein äußerst komplexer und vielschichtiger Prozeß. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Glucocorticoid-Rezeptors dargestellt.

Die Charakterisierung weiterer neuer nGRE-regulierter Zielgene ist sicher ein interessanter Punkt, den es weiter zu verfolgen gilt. Hierzu haben Microarray-Analysen aus dem Labor von Günther Schütz (DKFZ) eine wertvolle Basis gelegt. Es gibt Hinweise auf weitere Cis-reprimierte Gene, die in der Immunmodulation und in der Apoptose eine Rolle spielen. Die Klonierung und Analyse dieser Gene mit den hier am Beispiel des FasL- und SOCS-3 Promotors vorgestellten methodischen Konzepten steht im Zentrum der weiteren Bemühungen.

Auch soll die Rolle des Korepressors NCoR für die GR-vermittelte Cis-Repression weiter untersucht werden. Es ist von großem Interesse, ergänzend zu den jetzt vorhandenen *in vitro*-Daten die Situation in der intakten Zelle zu untersuchen und zu klären, ob NCoR *in vivo* die erwartete Rolle spielt; ob es sich dabei um einen universellen Mechanismus handelt, oder ob die jeweiligen Zielgene unterschiedlich reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Analyse der nGREs neben dem Mechanismus der Transrepression vermutlich von größerer Bedeutung ist, als man bisher angenommen hat. Die stärkere Berücksichtigung dieses in den Hintergrund geratenen Bereiches wird sicher einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Wirkmechanismen der Glucocorticoide leisten.

7. Literatur

- Aguilera, G., J. P. Harwood, J. X. Wilson, J. Morell, J. H. Brown und K. J. Catt (1983). "Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells." *J Biol Chem* **258**(13): 8039-45.
- Akerblom, I. E., E. P. Slater, M. Beato, J. D. Baxter und P. L. Mellon (1988). "Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer." *Science* **241**(4863): 350-3.
- Akner, G., A. C. Wikstrom und J. A. Gustafsson (1995). "Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules." *J Steroid Biochem Mol Biol* **52**(1): 1-16.
- Alderson, M. R., T. W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K. A. Schooley, R. G. Goodwin, C. A. Smith, F. Ramsdell und D. H. Lynch (1995). "Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes." *J Exp Med* **181**(1): 71-7.
- Alland, L., R. Muhle, H. Hou, Jr., J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus und R. A. DePinho (1997). "Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression." *Nature* **387**(6628): 49-55.
- Almawi, W. Y. und O. K. Melemedjian (2002). "Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor." *J Leukoc Biol* **71**(1): 9-15.
- Angel, P. und 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.
- Aranda, A. und A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." *Physiol Rev* **81**(3): 1269-304.
- Arbiser, J. L., C. Martinez, Z. K. Arbiser, G. K. Adler, L. B. Rosen und J. A. Majzoub (1994). "Regulation of the ectopically expressed human glycoprotein alpha-subunit gene in the human hepatoma cell line NPLC." *Endocrinology* **134**(2): 582-7.
- Arents, G., R. W. Burlingame, B. C. Wang, W. E. Love und E. N. Moudrianakis (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10148-52.
- Aritake, N., Y. Tamaki, N. Masuda, Y. Nakano, T. Monden, S. Noguchi und M. Monden (2004). "High expression of two genes selected by iAFLP: A new prognostic factor of estrogen receptor-positive breast cancer." *Oncol Rep* **12**(2): 381-7.
- Ashburner, B. P., S. D. Westerheide und A. S. Baldwin, Jr. (2001). "The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7065-77.
- Ashkenazi, A. und V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 255-60.
- Auernhammer, C. J., C. Bousquet und S. Melmed (1999). "Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6964-9.
- Auernhammer, C. J. und S. Melmed (2001). "The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface." *J Clin Invest* **108**(12): 1735-40.
- Autelitano, D. J. und D. R. Cohen (1996). "CRF stimulates expression of multiple fos and jun related genes in the AtT-20 corticotroph cell." *Mol Cell Endocrinol* **119**(1): 25-35.
- Ayer, D. E., Q. A. Lawrence und R. N. Eisenman (1995). "Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3." *Cell* **80**(5): 767-76.
- Bamberger, C. M., A. M. Bamberger, M. de Castro und G. P. Chrousos (1995). "Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans." *J Clin Invest* **95**(6): 2435-41.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire und T. Kouzarides (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo

domain." *Nature* **410**(6824): 120-4.

Baretino, D., M. M. Vivanco Ruiz und H. G. Stunnenberg (1994). "Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor." *Embo J* **13**(13): 3039-49.

Barker, C. F. und R. E. Billingham (1977). "Immunologically privileged sites." *Adv Immunol* **25**: 1-54.

Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms." *Clin Sci (Lond)* **94**(6): 557-72.

Barnes, P. J. und M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." *N Engl J Med* **336**(15): 1066-71.

Baumann, S., J. Hess, S. T. Eichhorst, A. Krueger, P. Angel, P. H. Krammer und S. Kirchhoff (2003). "An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells." *Oncogene* **22**(9): 1333-9.

Baumann, S., A. Krueger, S. Kirchhoff und P. H. Krammer (2002). "Regulation of T cell apoptosis during the immune response." *Curr Mol Med* **2**(3): 257-72.

Beato, M. (1996). "Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promoter." *J Mol Med* **74**(12): 711-24.

Beato, M., G. Chalepakis, M. Schauer und E. P. Slater (1989). "DNA regulatory elements for steroid hormones." *J Steroid Biochem* **32**(5): 737-47.

Beato, M., P. Herrlich und G. Schutz (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." *Cell* **83**(6): 851-7.

Becker, P. B. und W. Hörz (2002). "ATP-dependent nucleosome remodeling." *Annu Rev Biochem* **71**: 247-73.

Bledsoe, R. K., V. G. Montana, T. B. Stanley, C. J. Delves, C. J. Apolito, D. D. McKee, T. G. Consler, D. J. Parks, E. L. Stewart, T. M. Willson, M. H. Lambert, J. T. Moore, K. H. Pearce und H. E. Xu (2002). "Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition." *Cell* **110**(1): 93-105.

Borngraeber, S., M. J. Budny, G. Chiellini, S. T. Cunha-Lima, M. Togashi, P. Webb, J. D. Baxter, T. S. Scanlan und R. J. Fletterick (2003). "Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15358-63.

Bourguet, W., M. Ruff, D. Bonnier, F. Granger, M. Boeglin, P. Chambon, D. Moras und H. Gronemeyer (1995a). "Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor." *Protein Expr Purif* **6**(5): 604-8.

Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer und D. Moras (1995b). "Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha." *Nature* **375**(6530): 377-82.

Bourguet, W., V. Vivat, J. M. Wurtz, P. Chambon, H. Gronemeyer und D. Moras (2000). "Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains." *Mol Cell* **5**(2): 289-98.

Brown, C. E., T. Lechner, L. Howe und J. L. Workman (2000). "The many HATs of transcription coactivators." *Trends Biochem Sci* **25**(1): 15-9.

Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware und et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." *Nature* **373**(6513): 441-4.

Brzozowski, A. M., A. C. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson und M. Carlquist (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* **389**(6652): 753-8.

Burns, K., B. Duggan, E. A. Atkinson, K. S. Famulski, M. Nemer, R. C. Bleackley und M. Michalak (1994). "Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor." *Nature* **367**(6462): 476-80.

Cadepond, F., A. Ulmann und E. E. Baulieu (1997). "RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses." *Annu Rev Med* **48**: 129-56.

Calle, C., J. Campion, M. Garcia-Arencibia, B. Maestro und N. Davila (2003). "Transcriptional inhibition of the human insulin receptor gene by aldosterone." *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**(5): 543-53.

Cato, A. C. und E. Wade (1996). "Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorti-

coids." *Bioessays* **18**(5): 371-378.

Cell (1999). "A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily." *Cell* **97**(2): 161-3.

Chandran, U. R., B. Attardi, R. Friedman, Z. Zheng, J. L. Roberts und D. B. DeFranco (1996). "Glucocorticoid repression of the mouse gonadotropin-releasing hormone gene is mediated by promoter elements that are recognized by heteromeric complexes containing glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **271**(34): 20412-20.

Chandran, U. R., B. S. Warren, C. T. Baumann, G. L. Hager und D. B. DeFranco (1999). "The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element." *J Biol Chem* **274**(4): 2372-8.

Chang, M. M., M. Juarez, D. M. Hyde und R. Wu (2001). "Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(1): L107-15.

Chang, T. J., B. M. Scher, S. Waxman und W. Scher (1993). "Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation." *Mol Endocrinol* **7**(4): 528-42.

Chatterjee, V. K., L. D. Madison, S. Mayo und J. L. Jameson (1991). "Repression of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene by glucocorticoids: evidence for receptor interactions with limiting transcriptional activators." *Mol Endocrinol* **5**(1): 100-10.

Chauhan, D., D. Auclair, E. K. Robinson, T. Hideshima, G. Li, K. Podar, D. Gupta, P. Richardson, R. L. Schlossman, N. Krett, L. B. Chen, N. C. Munshi und K. C. Anderson (2002). "Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays." *Oncogene* **21**(9): 1346-58.

Chen, S., J. Wang, G. Yu, W. Liu und D. Pearce (1997). "Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity." *J Biol Chem* **272**(22): 14087-92.

Chesnokova, V., A. Kariagina und S. Melmed (2002). "Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(5): E1110-8.

Cheung, P., C. D. Allis und P. Sassone-Corsi (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." *Cell* **103**(2): 263-71.

Chow, W. A., J. J. Fang und J. K. Yee (2000). "The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells." *J Immunol* **164**(7): 3512-8.

Chretien, M. und N. G. Seidah (1981). "Chemistry and biosynthesis of pro-opiomelanocortin. ACTH, MSH's, endorphins and their related peptides." *Mol Cell Biochem* **34**(2): 101-27.

Cole, T. J., J. A. Blendy, A. P. Monaghan, K. Kriegelstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker und G. Schütz (1995). "Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation." *Genes Dev* **9**(13): 1608-21.

Collingwood, T. N., F. D. Urnov und A. P. Wolffe (1999). "Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription." *J Mol Endocrinol* **23**(3): 255-75.

Cui, H., D. H. Sherr, M. el-Khatib, K. Matsui, D. J. Panka, A. Marshak-Rothstein und S. T. Ju (1996). "Regulation of Tcell death genes: selective inhibition of FasL- but not Fas-mediated function." *Cell Immunol* **167**(2): 276-84.

Dahiya, A., S. Wong, S. Gonzalo, M. Gavin und D. C. Dean (2001). "Linking the Rb and polycomb pathways." *Mol Cell* **8**(3): 557-69.

Danielian, P. S., R. White, J. A. Lees und M. G. Parker (1992). "Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors." *Embo J* **11**(3): 1025-33.

Davis, P. J., A. Shih, H. Y. Lin, L. J. Martino und F. B. Davis (2000). "Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR." *J Biol Chem* **275**(48): 38032-9.

De Bosscher, K., M. L. Schmitz, W. Vanden Berghe, S. Plaisance, W. Fiers und G. Haegeman (1997).

- "Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13504-9.
- de Kloet, R. E. (2003). "Hormones, brain and stress." *Endocr Regul* **37**(2): 51-68.
- Deblois, G. und V. Giguere (2003). "Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation." *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**(2-5): 123-31.
- Deckert, J. und K. Struhl (2001). "Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors." *Mol Cell Biol* **21**(8): 2726-2735.
- Dedhar, S., P. S. Rennie, M. Shago, C. Y. Hagesteijn, H. Yang, J. Filmus, R. G. Hawley, N. Bruchofsky, H. Cheng, R. J. Matusik und et al. (1994). "Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin." *Nature* **367**(6462): 480-3.
- DeFranco, D. B. (2002). "Functional implications of glucocorticoid receptor trafficking." *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 91-109.
- Deroo, B. J. und T. K. Archer (2001). "Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo." *Oncogene* **20**(24): 3039-46.
- Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K. M. Debatin und P. H. Krammer (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." *Nature* **373**(6513): 438-41.
- Diamond, M. I., J. N. Miner, S. K. Yoshinaga und K. R. Yamamoto (1990). "Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element." *Science* **249**(4974): 1266-72.
- Dostert, A. und T. Heinzl (2002). "DNA-dependent cofactor selectivity of the glucocorticoid receptor." *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 279-95.
- Dostert, A. und T. Heinzl (2004). "Negative Glucocorticoid Receptor Response Elements and their Role in Glucocorticoid Action." *Current Pharmaceutical Design*.
- Dostert, A. a. H., T (2004). "Negative Glucocorticoid Receptor Response Elements and their Role in Glucocorticoid Action." *Curr Pharm Des* **in press**.
- Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." *Nucleic Acids Res* **16**(13): 6127-45.
- Downes, M., M. A. Verdecia, A. J. Roecker, R. Hughes, J. B. Hogenesch, H. R. Kast-Woelbern, M. E. Bowman, J. L. Ferrer, A. M. Anisfeld, P. A. Edwards, J. M. Rosenfeld, J. G. Alvarez, J. P. Noel, K. C. Nicolaou und R. M. Evans (2003). "A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR." *Mol Cell* **11**(4): 1079-92.
- Dressel, U., R. Renkawitz und A. Baniahmad (2000). "Promoter specific sensitivity to inhibition of histone deacetylases: implications for hormonal gene control, cellular differentiation and cancer." *Anti-cancer Res* **20**(2A): 1017-22.
- Dressel, U., D. Thormeyer, B. Altincicek, A. Paululat, M. Eggert, S. Schneider, S. P. Tenbaum, R. Renkawitz und A. Baniahmad (1999). "Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3383-94.
- Drouin, J., M. Chamberland, J. Charron, L. Jeannotte und M. Nemer (1985). "Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene." *FEBS Lett* **193**(1): 54-8.
- Drouin, J., Y. L. Sun, M. Chamberland, Y. Gauthier, A. De Lean, M. Nemer und T. J. Schmidt (1993). "Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene." *Embo J* **12**(1): 145-56.
- Drouin, J., Y. L. Sun, S. Tremblay, P. Lavender, T. J. Schmidt, A. de Lean und M. Nemer (1992). "Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor." *Mol Endocrinol* **6**(8): 1299-309.
- Durand, B., M. Saunders, C. Gaudon, B. Roy, R. Losson und P. Chambon (1994). "Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity." *Embo J* **13**(22): 5370-82.
- Eggert, M., C. C. Mows, D. Tripier, R. Arnold, J. Michel, J. Nickel, S. Schmidt, M. Beato und R. Renkawitz (1995). "A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates

receptor-dependent transcription in vitro." *J Biol Chem* **270**(51): 30755-9.

Eilers, A. L., A. N. Billin, J. Liu und D. E. Ayer (1999). "A 13-amino acid amphipathic alpha-helix is required for the functional interaction between the transcriptional repressor Mad1 and mSin3A." *J Biol Chem* **274**(46): 32750-6.

Fejes-Toth, G., D. Pearce und A. Naray-Fejes-Toth (1998). "Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2973-8.

Fernandes, I., Y. Bastien, T. Wai, K. Nygard, R. Lin, O. Cormier, H. S. Lee, F. Eng, N. R. Bertos, N. Pelletier, S. Mader, V. K. Han, X. J. Yang und J. H. White (2003). "Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms." *Mol Cell* **11**(1): 139-50.

Forman, B. M. und H. H. Samuels (1990). "Dimerization among nuclear hormone receptors." *New Biol* **2**(7): 587-94.

Franchimont, D., J. Galon, M. S. Vacchio, S. Fan, R. Visconti, D. M. Frucht, V. Geenen, G. P. Chrousos, J. D. Ashwell und J. J. O'Shea (2002). "Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha." *J Immunol* **168**(5): 2212-8.

Franchimont, D., T. Kino, J. Galon, G. U. Meduri und G. Chrousos (2003). "Glucocorticoids and Inflammation Revisited: The State of the Art. NIH Clinical Staff Conference." *Neuroimmunomodulation* **10**(5): 247-60.

Freedman, L. P., B. F. Luisi, Z. R. Korszun, B. R. P. B. Sigler und K. R. Yamamoto (1988). "The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain." *Nature* **334**: 543-546.

Freeman, B. C. und K. R. Yamamoto (2001). "Continuous recycling: a mechanism for modulatory signal transduction." *Trends Biochem Sci* **26**(5): 285-90.

Freeman, B. C. und K. R. Yamamoto (2002). "Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones." *Science* **296**(5576): 2232-5.

Freitas, A. A. und B. Rocha (1999). "Peripheral T cell survival." *Curr Opin Immunol* **11**(2): 152-6.

Fryer, C. J. und T. K. Archer (1998). "Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex." *Nature* **393**(6680): 88-91.

Fu, M., M. Rao, C. Wang, T. Sakamaki, J. Wang, D. Di Vizio, X. Zhang, C. Albanese, S. Balk, C. Chang, S. Fan, E. Rosen, J. J. Palvimo, O. A. Janne, S. Muratoglu, M. L. Avantiaggiati und R. G. Pestell (2003). "Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8563-75.

Funder, J. W. (1993). "Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements." *Science* **259**(5098): 1132-3.

Galon, J., D. Franchimont, N. Hiroi, G. Frey, A. Boettner, M. Ehrhart-Bornstein, J. J. O'Shea, G. P. Chrousos und S. R. Bornstein (2002). "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells." *Faseb J* **16**(1): 61-71.

Gauthier, J. M., B. Bourachot, V. Doucas, M. Yaniv und F. Moreau-Gachelin (1993). "Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors." *Embo J* **12**(13): 5089-96.

Geserick, C., H. A. Meyer, K. Barbulescu und B. Haendler (2003). "Differential modulation of androgen receptor action by deoxyribonucleic acid response elements." *Mol Endocrinol* **17**(9): 1738-50.

Giordano, C., G. Stassi, R. De Maria, M. Todaro, P. Richiusa, G. Papoff, G. Ruberti, M. Bagnasco, R. Testi und A. Galluzzo (1997). "Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis." *Science* **275**(5302): 960-3.

Glass, C. K., J. M. Holloway, O. V. Devary und M. G. Rosenfeld (1988). "The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements." *Cell* **54**(3): 313-23.

Glass, C. K., M. G. Rosenfeld, D. W. Rose, R. Kurokawa, Y. Kamei, L. Xu, J. Torchia, M. H. Ogliastro und S. Westin (1997). "Mechanisms of transcriptional activation by retinoic acid receptors." *Biochem Soc Trans* **25**(2): 602-5.

- Gonzales, L. W., S. H. Guttentag, K. C. Wade, A. D. Postle und P. L. Ballard (2002). "Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**(5): L940-51.
- Gottschling, D. E. (2000). "Gene silencing: two faces of SIR2." *Curr Biol* **10**(19): R708-11.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell und R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Gray, S. G. und T. J. Ekstrom (2001). "The human histone deacetylase family." *Exp Cell Res* **262**(2): 75-83.
- Greenstein, S., K. Ghias, N. L. Krett und S. T. Rosen (2002). "Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies." *Clin Cancer Res* **8**(6): 1681-94.
- Groner, B. und C. Shemanko (2002). "Cooperation of nuclear transcription factors regulated by steroid and peptide hormones." *Emst Schering Res Found Workshop*(40): 213-31.
- Grose, R., S. Werner, D. Kessler, J. P. Tuckermann, K. Huggel, S. Durka, H. M. Reichardt und S. Werner (2002). "A role for endogenous glucocorticoids in wound repair." *EMBO Rep* **3**(6): 1-8.
- Gross, A., J. M. McDonnell und S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **13**(15): 1899-911.
- Grunstein, M. (1990). "Histone function in transcription." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 643-78.
- Guertin, M., H. LaRue, D. Bernier, O. Wrangé, M. Chevrette, M. C. Gingras und L. Belanger (1988). "Enhancer and promoter elements directing activation and glucocorticoid repression of the alpha 1-fetoprotein gene in hepatocytes." *Mol Cell Biol* **8**(4): 1398-407.
- Gueydan, C., L. Droogmans, P. Chalon, G. Huez, D. Caput und V. Kruys (1999). "Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA." *J Biol Chem* **274**(4): 2322-6.
- Guschin, D., P. A. Wade, N. Kikyo und A. P. Wolffe (2000). "ATP-Dependent histone octamer mobilization and histone deacetylation mediated by the Mi-2 chromatin remodeling complex." *Biochemistry* **39**(18): 5238-45.
- Hager, G. L., C. S. Lim, C. Elbi und C. T. Baumann (2000). "Trafficking of nuclear receptors in living cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 249-54.
- Hassig, C. A., T. C. Fleischer, A. N. Billin, S. L. Schreiber und D. E. Ayer (1997). "Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A." *Cell* **89**: 341-47.
- Hebbar, P. B. und T. K. Archer (2003). "Chromatin remodeling by nuclear receptors." *Chromosoma* **111**(8): 495-504.
- Heck, S., K. Bender, M. Kullmann, M. Gottlicher, P. Herrlich und A. C. Cato (1997). "I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor." *Embo J* **16**(15): 4698-707.
- Heck, S., M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich und A. C. Cato (1994). "A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1." *Embo J* **13**(17): 4087-95.
- Heinzel, T., R. M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Soderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W. M. Yang, G. Brard, S. D. Ngo, J. R. Davie, E. Seto, R. N. Eisenman, D. W. Rose, C. K. Glass und M. G. Rosenfeld (1997). "A complex containing NCoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression." *Nature* **387**(6628): 43-8.
- Hermanson, O., C. K. Glass und M. G. Rosenfeld (2002). "Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification." *Trends Endocrinol Metab* **13**(2): 55-60.
- Herrlich, P. (2001). "Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1." *Oncogene* **20**(19): 2465-75.
- Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman und M. Montminy (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 179-83.
- Hill, D. A. (2001). "Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling." *Biochem Cell Biol* **79**(3): 317-24.

- Hong, H., K. Kohli, M. J. Garabedian und M. R. Stallcup (1997). "GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors." *Mol Cell Biol* **17**(5): 2735-44.
- Hong, S. H. und M. L. Privalsky (2000). "The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6612-25.
- Hörlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzel, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass und et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Horn, P. J. und C. L. Peterson (2002). "Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription." *Science* **297**(5588): 1824-7.
- Hsiao, P. W., B. J. Deroo und T. K. Archer (2002). "Chromatin remodeling and tissue-selective responses of nuclear hormone receptors." *Biochem Cell Biol* **80**(3): 343-51.
- Hsieh, J. C., P. W. Jurutka, S. H. Selznick, M. C. Reeder, C. A. Haussler, G. K. Whitfield und M. R. Haussler (1995). "The T-box near the zinc fingers of the human vitamin D receptor is required for heterodimeric DNA binding and transactivation." *Biochem Biophys Res Commun* **215**(1): 1-7.
- Htun, H., J. Barsony, I. Renyi, D. L. Gould und G. L. Hager (1996). "Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4845-50.
- Htun, H., L. T. Holth, D. Walker, J. R. Davie und G. L. Hager (1999). "Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor." *Mol Biol Cell* **10**(2): 471-86.
- Hu, X. und M. A. Lazar (1999). "The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors." *Nature* **402**(6757): 93-6.
- Hu, X., Y. Li und M. A. Lazar (2001). "Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1747-58.
- Huang, E. Y., J. Zhang, E. A. Miska, M. G. Guenther, T. Kouzarides und M. A. Lazar (2000). "Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway." *Genes Dev* **14**(1): 45-54.
- Imada, K. und W. J. Leonard (2000). "The Jak-STAT pathway." *Mol Immunol* **37**(1-2): 1-11.
- Imai, E., J. N. Miner, J. A. Mitchell, K. R. Yamamoto und D. K. Granner (1993). "Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids." *J Biol Chem* **268**(8): 5353-6.
- Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaerberlein und L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* **403**(6771): 795-800.
- Ito, K., P. J. Barnes und I. M. Adcock (2000a). "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6891-903.
- Ito, K., P. J. Barnes und I. M. Adcock (2000b). "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6891-903.
- Jenuwein, T. und C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* **293**(5532): 1074-80.
- Jin, W. D., A. L. Boutillier, M. J. Glucksman, S. R. Salton, J. P. Loeffler und J. L. Roberts (1994). "Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein." *Mol Endocrinol* **8**(10): 1377-88.
- Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta und P. Herrlich (1990). "Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone." *Cell* **62**(6): 1189-204.
- Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger und A. Marshak-Rothstein (1995). "Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation." *Nature* **373**(6513): 444-8.

- Kallen, J. A., J. M. Schlaeppi, F. Bitsch, S. Geisse, M. Geiser, I. Delhon und B. Fournier (2002). "X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha." *Structure (Camb)* **10**(12): 1697-707.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass und M. G. Rosenfeld (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." *Cell* **85**(3): 403-14.
- Kao, H. Y., M. Downes, P. Ordentlich und R. M. Evans (2000). "Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression." *Genes Dev* **14**(1): 55-66.
- Kasibhatla, S., L. Genestier und D. R. Green (1999). "Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB." *J Biol Chem* **274**(2): 987-92.
- Kaspar, F., H. Klocker, A. Denninger und A. C. Cato (1993). "A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: identification of the function of a conserved alanine residue in the D box of steroid receptors." *Mol Cell Biol* **13**(12): 7850-8.
- Khochbin, S., A. Verdel, C. Lemerrier und D. Seigneurin-Berny (2001). "Functional significance of histone deacetylase diversity." *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 162-166.
- Khoo, B. und A. B. Grossman (2003). "Normal physiology of the hypothalamus and anterior pituitary in man." www.endotext.org.
- Kiernan, R., V. Bres, R. W. Ng, M. P. Coudart, S. El Messaoudi, C. Sardet, D. Y. Jin, S. Emiliani und M. Benkirane (2003). "Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65." *J Biol Chem* **278**(4): 2758-66.
- Kile, B. T. und W. S. Alexander (2001). "The suppressors of cytokine signalling (SOCS)." *Cell Mol Life Sci* **58**(11): 1627-35.
- King, B. R., R. Smith und R. C. Nicholson (2002). "Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter." *Mol Cell Endocrinol* **194**(1-2): 19-28.
- Kirchhoff, S., T. Sebens, S. Baumann, A. Krueger, R. Zawatzky, M. Li-Weber, E. Meinel, F. Neipel, B. Fleckenstein und P. H. Krammer (2002). "Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter." *J Immunol* **168**(3): 1226-34.
- Kirfel, J., M. Kelter, L. M. Cancela, P. A. Price und R. Schule (1997). "Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2227-32.
- Klas, C., K. M. Debatin, R. R. Jonker und P. H. Krammer (1993). "Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells." *Int Immunol* **5**(6): 625-30.
- Knowles, B. B. und D. B. Aden (1983). Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. *U.S. Patent*.
- Knutti, D., A. Kaul und A. Kralli (2000). "A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2411-22.
- Krammer, P. H. (1999). "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." *Adv Immunol* **71**: 163-210.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**(6805): 789-95.
- Kroemer, G. (1997). "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis." *Nat Med* **3**(6): 614-20.
- Kubo, M., T. Hanada und A. Yoshimura (2003). "Suppressors of cytokine signaling and immunity." *Nat Immunol* **4**(12): 1169-76.
- Kuo, M. H., E. vom Baur, K. Struhl und C. D. Allis (2000). "Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription." *Mol Cell* **6**(6): 1309-20.
- Kutoh, E., P. E. Stromstedt und L. Poellinger (1992). "Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF-1." *Mol Cell Biol* **12**(11): 4960-9.
- Ladman, A. J., J. E. Palm und M. N. Runner (1953). "Bioassay of mouse pituitary gonadotropin by

- induced ovulation in pregnant mice; evaluation and biologic application." *Proc Soc Exp Biol Med* **84**(3): 582-4.
- Laherty, C. D., W. M. Yang, J. M. Sun, J. R. Davie, E. Seto und R. N. Eisenman (1997). "Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression." *Cell* **89**(3): 349-56.
- Landry, J., A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus und R. Sternglanz (2000). "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5807-11.
- Larsen, L. und C. Ropke (2002). "Suppressors of cytokine signalling: SOCS." *Apmis* **110**(12): 833-44.
- Lasa, M., M. Brook, J. Saklatvala und A. R. Clark (2001). "Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38." *Mol Cell Biol* **21**(3): 771-80.
- Latinis, K. M., L. L. Carr, E. J. Peterson, L. A. Norian, S. L. Eliason und G. A. Koretzky (1997). "Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events." *J Immunol* **158**(10): 4602-11.
- Lefebvre, P., P. M. Danze, B. Sablonniere, C. Richard, P. Formstecher und M. Dautrevaux (1988). "Association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90K nonsteroid-binding component is stabilized by both steroidal and nonsteroidal antiglucocorticoids in intact cells." *Biochemistry* **27**(26): 9186-94.
- Lefstin, J. A. und K. R. Yamamoto (1998). "Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators." *Nature* **392**(6679): 885-8.
- Leung, D. Y. und J. W. Bloom (2003). "Update on glucocorticoid action and resistance." *J Allergy Clin Immunol* **111**(1): 3-22; quiz 23.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. New York, Oxford University Press.
- Li, J., J. Wang, Z. Nawaz, J. M. Liu, J. Qin und J. Wong (2000). "Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3." *Embo J* **19**(16): 4342-50.
- Li, X., J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai und B. W. O'Malley (2003). "Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification." *Mol Cell Biol* **23**(11): 3763-73.
- Liden, J., F. Delaunay, I. Rafter, J. Gustafsson und S. Okret (1997). "A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation." *J Biol Chem* **272**(34): 21467-72.
- Lim, C. S., C. T. Baumann, H. Htun, W. Xian, M. Irie, C. L. Smith und G. L. Hager (1999). "Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras." *Mol Endocrinol* **13**(3): 366-75.
- Lipkin, S. M., C. A. Nelson, C. K. Glass und M. G. Rosenfeld (1992). "A negative retinoic acid response element in the rat oxytocin promoter restricts transcriptional stimulation by heterologous transactivation domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1209-13.
- Li-Weber, M. und P. H. Krammer (2003). "Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system." *Semin Immunol* **15**(3): 145-57.
- Li-Weber, M., O. Laur, K. Dern und P. H. Krammer (2000). "T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB." *Eur J Immunol* **30**(2): 661-70.
- Li-Weber, M., P. Salgame, C. Hu, I. V. Davydov, O. Laur, S. Klevenz und P. H. Krammer (1998). "Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter." *J Immunol* **161**(3): 1380-9.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent und T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution." *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Luger, K. und T. J. Richmond (1998). "The histone tails of the nucleosome." *Curr Opin Genet Dev* **8**(2): 140-6.
- Luisi, B. F., W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto und P. B. Sigler (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." *Nature* **352**(6335): 497-505.

- Madiehe, A. M., L. Lin, C. White, H. D. Braymer, G. A. Bray und D. A. York (2001). "Constitutive activation of STAT-3 and downregulation of SOCS-3 expression induced by adrenalectomy." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(6): R2048-58.
- Magiakou, M. und G. Chrousos (2002). "Glucocorticoid therapy and adrenal suppression." www.endotext.org
- Malkoski, S. P. und R. I. Dorin (1999). "Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene." *Mol Endocrinol* **13**(10): 1629-44.
- Malkoski, S. P., C. M. Handanos und R. I. Dorin (1997). "Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene." *Mol Cell Endocrinol* **127**(2): 189-99.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon und et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-9.
- Marine, J. C., C. McKay, D. Wang, D. J. Topham, E. Parganas, H. Nakajima, H. Pendeville, H. Yasukawa, A. Sasaki, A. Yoshimura und J. N. Ihle (1999). "SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis." *Cell* **98**(5): 617-27.
- Matsui, K., A. Fine, B. Zhu, A. Marshak-Rothstein und S. T. Ju (1998). "Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma." *J Immunol* **161**(7): 3469-73.
- Matsui, K., S. Xiao, A. Fine und S. T. Ju (2000). "Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine fasl promoter." *J Immunol* **164**(6): 3002-8.
- Mazumdar, A., R. A. Wang, S. K. Mishra, L. Adam, R. Bagheri-Yarmand, M. Mandal, R. K. Vadlamudi und R. Kumar (2001). "Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor." *Nat Cell Biol* **3**(1): 30-37.
- McCormick, S. M., S. G. Eskin, L. V. McIntire, C. L. Teng, C. M. Lu, C. G. Russell und K. K. Chittur (2001). "DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 8955-60.
- McNally, J. G., W. G. Muller, D. Walker, R. Wolford und G. L. Hager (2000). "The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells." *Science* **287**(5456): 1262-5.
- Medema, J. P., R. E. Toes, C. Scaffidi, T. S. Zheng, R. A. Flavell, C. J. Melief, M. E. Peter, R. Offringa und P. H. Krammer (1997). "Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis." *Eur J Immunol* **27**(12): 3492-8.
- Meier, T. und F. Fahrenholz (1996). *A laboratory guide to biotin-labeling in biomolecule analysis*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag.
- Meijer, O. C., T. J. Cole, W. Schmid, G. Schutz, M. Joels und E. R. De Kloet (1997). "Regulation of hippocampal 5-HT1A receptor mRNA and binding in transgenic mice with a targeted disruption of the glucocorticoid receptor." *Brain Res Mol Brain Res* **46**(1-2): 290-6.
- Meijer, O. C., A. Williamson, M. F. Dallman und D. Pearce (2000). "Transcriptional repression of the 5-HT1A receptor promoter by corticosterone via mineralocorticoid receptors depends on the cellular context." *J Neuroendocrinol* **12**(3): 245-54.
- Meyer, T., J. Carlstedt-Duke und D. B. Starr (1997a). "A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene." *J Biol Chem* **272**(49): 30709-14.
- Meyer, T., J. A. Gustafsson und J. Carlstedt-Duke (1997b). "Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box." *DNA Cell Biol* **16**(8): 919-27.
- Mittelstadt, P. R. und J. D. Ashwell (1998). "Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3744-51.
- Mittelstadt, P. R. und J. D. Ashwell (1999). "Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells." *J Biol Chem* **274**(5): 3222-7.
- Mordacq, J. C. und D. I. Linzer (1989). "Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression." *Genes Dev* **3**(6): 760-9.

- Muchardt, C. und M. Yaniv (1993). "A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor." *Embo J* **12**(11): 4279-90.
- Müller, M. und R. Renkawitz (1991). "The glucocorticoid receptor." *Biochim Biophys Acta* **1088**(2): 171-82.
- Nagaich, A. K., G. V. Rayasam, E. D. Martinez, M. Becker, Y. Qiu, T. A. Johnson, C. Elbi, T. M. Fletcher, S. John und G. L. Hager (2004a). "Subnuclear trafficking and gene targeting by steroid receptors." *Ann N Y Acad Sci* **1024**: 213-20.
- Nagaich, A. K., D. A. Walker, R. Wolford und G. L. Hager (2004b). "Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling." *Mol Cell* **14**(2): 163-74.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-65.
- Nagy, L., H. Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber und R. M. Evans (1997). "Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase." *Cell* **89**(3): 373-80.
- Nakabayashi, H., Y. Koyama, M. Sakai, H. M. Li, N. C. Wong und S. Nishi (2001). "Glucocorticoid stimulates primate but inhibits rodent alpha-fetoprotein gene promoter." *Biochem Biophys Res Commun* **287**(1): 160-72.
- Nalda, A. M., J. A. Martial und M. Muller (1997). "The glucocorticoid receptor inhibits the human prolactin gene expression by interference with Pit-1 activity." *Mol Cell Endocrinol* **134**(2): 129-37.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan und R. E. Kingston (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* **108**(4): 475-87.
- Newton, R. (2000). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?" *Thorax* **55**(7): 603-13.
- Newton, R., J. Seybold, L. M. Kuitert, M. Bergmann und P. J. Barnes (1998). "Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA." *J Biol Chem* **273**(48): 32312-21.
- Nissen, R. M. und K. R. Yamamoto (2000). "The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain." *Genes Dev* **14**(18): 2314-29.
- Nolte, R. T., G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass und M. V. Milburn (1998). "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *Nature* **395**(6698): 137-43.
- Nordeen, S. K. (1988). "Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers." *Biotechniques* **6**(5): 454-8.
- Nordeen, S. K., B. J. Suh, B. Kuhnel und C. D. Hutchison (1990). "Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element." *Mol Endocrinol* **4**(12): 1866-73.
- Norian, L. A., K. M. Latinis und G. A. Koretzky (1998). "A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes." *J Immunol* **161**(3): 1078-82.
- Novac, N. und T. Heinzl (2004). "Nuclear Receptors: overview and classification." *Ernst Schering Res Found Workshop*.
- Ohe, Y., H. Hayashi und K. Iwai (1989). "Human spleen histone H1. Isolation and amino acid sequences of three minor variants, H1a, H1c, and H1d." *J Biochem (Tokyo)* **106**(5): 844-57.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, M. J. Tsai und B. W. O'Malley (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-7.
- Oro, A. E., S. M. Hollenberg und R. M. Evans (1988). "Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor-beta-galactosidase fusion protein." *Cell* **55**(6): 1109-14.
- Orphanides, G. und D. Reinberg (2000). "RNA polymerase II elongation through chromatin." *Nature* **407**(6803): 471-5.
- Ou, X. M., J. M. Storrington, N. Kushwaha und P. R. Albert (2001). "Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene."

J Biol Chem **276**(17): 14299-307.

Paul, C., I. Seilliez, J. P. Thissen und A. Le Cam (2000). "Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids mRNA analysis and promoter characterization." *Eur J Biochem* **267**(19): 5849-57.

Pazin, M. J. und J. T. Kadonaga (1997). "What's up and down with histone deacetylation and transcription?" *Cell* **89**(3): 325-8.

Pearce, D., W. Matsui, J. N. Miner und K. R. Yamamoto (1998). "Glucocorticoid receptor transcriptional activity determined by spacing of receptor and nonreceptor DNA sites." *J Biol Chem* **273**(46): 30081-5.

Pei, L. (1996). "Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene." *J Biol Chem* **271**(34): 20879-84.

Perlmann, T., P. N. Rangarajan, K. Umesono und R. M. Evans (1993). "Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs." *Genes Dev* **7**(7B): 1411-22.

Petrone, E., R. Goldman, K. Calis, G. Chrousos und G. Cizza (2003). "Glucocorticoid-induced osteoporosis; basic mechanisms and clinical implications." www.endotext.org.

Pfahl, M. (1994). "Vertebrate receptors: molecular biology, dimerization and response elements." *Semin Cell Biol* **5**(2): 95-103.

Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo und J. Drouin (1997a). "Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells." *Mol Cell Biol* **17**(10): 5946-51.

Philips, A., M. Maira, A. Mullick, M. Chamberland, S. Lesage, P. Hugo und J. Drouin (1997b). "Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription." *Mol Cell Biol* **17**(10): 5952-9.

Picard, D. und K. R. Yamamoto (1987). "Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor." *Embo J* **6**(11): 3333-40.

Planey, S. L., M. T. Abrams, N. M. Robertson und G. Litwack (2003). "Role of apical caspases and glucocorticoid-regulated genes in glucocorticoid-induced apoptosis of pre-B leukemic cells." *Cancer Res* **63**(1): 172-8.

Poliard, A., L. Bakkali, M. Poirer, D. Foiret und J. L. Danan (1990). "Regulation of the rat alpha-fetoprotein gene expression in liver. Both the promoter region and an enhancer element are liver-specific and negatively modulated by dexamethasone." *J Biol Chem* **265**(4): 2137-41.

Pratt, W. B. (1992). "Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins." *Bioessays* **14**(12): 841-8.

Prestridge, D. S. (1991). "SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements." *CABIOS* **7**: 203-206.

Radoja, N., M. Komine, S. H. Jho, M. Blumenberg und M. Tomic-Canic (2000). "Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers." *Mol Cell Biol* **20**(12): 4328-39.

Radvanyi, L. G., G. B. Mills und R. G. Miller (1993). "Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death." *J Immunol* **150**(12): 5704-15.

Ray, A. und K. E. Prefontaine (1994). "Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 752-6.

Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel und G. Schütz (1998). "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival." *Cell* **93**(4): 531-41.

Reichardt, H. M., T. Umland, A. Bauer, O. Kretz und G. Schütz (2000). "Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock." *Mol Cell Biol* **20**(23): 9009-17.

Renaud, J. P. und D. Moras (2000). "Structural studies on nuclear receptors." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1748-69.

Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer und D. Moras (1995). "Crys-

- tal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid." *Nature* **378**(6558): 681-9.
- Riegel, A. T., Y. Lu, J. Remenick, R. G. Wolford, D. S. Berard und G. L. Hager (1991). "Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription." *Mol Endocrinol* **5**(12): 1973-82.
- Ringold, G. M., K. R. Yamamoto, G. M. Tomkins, M. Bishop und H. E. Varmus (1975). "Dexamethasone-mediated induction of mouse mammary tumor virus RNA: a system for studying glucocorticoid action." *Cell* **6**(3): 299-305.
- Robyr, D., A. P. Wolffe und W. Wahli (2000). "Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks." *Mol Endocrinol* **14**(3): 329-47.
- Rogatsky, I., J. C. Wang, M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. M. Haqq, B. D. Darimont, M. J. Garabedian und K. R. Yamamoto (2003). "Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13845-50.
- Rogatsky, I., K. A. Zarembek und K. R. Yamamoto (2001). "Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones." *Embo J* **20**(21): 6071-83.
- Rogers, S. L., G. Nabozny, M. McFarland, L. Pantages-Torok, J. Archer, F. Kalkbrenner, L. Zuvela-Jelaska, N. Haynes und H. Jiang (2004). *Nuclear Receptors: Steroid Sisters (J8)*. Keystone Symposia, Keystone, Colorado.
- Rundlett, S. E., A. A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B. M. Turner und M. Grunstein (1996). "HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14503-8.
- Saatcioglu, F., F. X. Claret und M. Karin (1994). "Negative transcriptional regulation by nuclear receptors." *Semin Cancer Biol* **5**(5): 347-59.
- Sakai, D. D., S. Helms, J. Carlstedt-Duke, J. A. Gustafsson, F. M. Rottman und K. R. Yamamoto (1988). "Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene." *Genes Dev* **2**(9): 1144-54.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer und M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *Embo J* **17**(6): 1675-87.
- Schaaf, M. J. und J. A. Cidlowski (2002). "The glucocorticoid receptor beta-isoform: a perspective on its relevance in human health and disease." *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 197-211.
- Schäcke, H., W. D. Docke und K. Asadullah (2002a). "Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids." *Pharmacol Ther* **96**(1): 23-43.
- Schäcke, H., H. Hennekes, A. Schottelius, S. Jaroch, M. Lehmann, N. Schmees, H. Rehwinkel und K. Asadullah (2002b). "SEGRAs: a novel class of anti-inflammatory compounds." *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 357-71.
- Scherer, W. F., J. T. Syverton und G. O. Gey (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J Exp Med* **97**(5): 695-710.
- Schmitz, I., S. Kirchhoff und P. H. Kramer (2000). "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways." *Int J Biochem Cell Biol* **32**(11-12): 1123-36.
- Schneider, S. L., S. A. Fuqua, K. V. Speeg, A. K. Tandon und W. L. McGuire (1990). "Isolation and characterization of an adriamycin-resistant breast tumor cell line." *In Vitro Cell Dev Biol* **26**(6): 621-8.
- Schneikert, J., H. Peterziel, P. A. Defossez, H. Klocker, Y. Launoit und A. C. Cato (1996). "Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression." *J Biol Chem* **271**(39): 23907-13.
- Schüle, R., P. Rangarajan, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, N. Yang, I. M. Verma und R. M. Evans (1990). "Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor." *Cell* **62**(6): 1217-26.
- Schulz, M., M. Eggert, A. Baniahmad, A. Dostert, T. Heinzl und R. Renkawitz (2002). "RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding." *J Biol Chem* **277**(29): 26238-43.

- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg und M. E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." *Eur J Biochem* **254**(3): 439-59.
- Seki, Y., H. Inoue, N. Nagata, K. Hayashi, S. Fukuyama, K. Matsumoto, O. Komine, S. Hamano, K. Himeno, K. Inagaki-Ohara, N. Cacalano, A. O'Garra, T. Oshida, H. Saito, J. A. Johnston, A. Yoshimura und M. Kubo (2003). "SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses." *Nat Med* **9**(8): 1047-54.
- Sheppard, K. A., K. M. Phelps, A. J. Williams, D. Thanos, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, M. E. Gerritsen und T. Collins (1998). "Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1." *J Biol Chem* **273**(45): 29291-4.
- Shiau, A. K., D. Barstad, J. T. Radek, M. J. Meyers, K. W. Nettles, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, D. A. Agard und G. L. Greene (2002). "Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism." *Nat Struct Biol* **9**(5): 359-64.
- Singer, G. G. und A. K. Abbas (1994). "The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice." *Immunity* **1**(5): 365-71.
- Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, J. C. Escalante-Semerena, C. Grubmeyer, C. Wolberger und J. D. Boeke (2000). "A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6658-63.
- Somasekhar, M. B. und J. Gorski (1988). "Two elements of the rat prolactin 5' flanking region are required for its regulation by estrogen and glucocorticoids." *Gene* **69**(1): 13-21.
- Song, L. N., B. Huse, S. Rusconi und S. S. Simons, Jr. (2001). "Transactivation specificity of glucocorticoid versus progesterone receptors. Role of functionally different interactions of transcription factors with amino- and carboxyl-terminal receptor domains." *J Biol Chem* **276**(27): 24806-16.
- Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-16.
- Sprent, J. und J. F. Miller (1976). "Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. III. Differentiation into long-lived recirculating memory cells." *Cell Immunol* **21**(2): 314-26.
- Stöcklin, E., M. Wissler, F. Gouilleux und B. Groner (1996). "Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor." *Nature* **383**(6602): 726-8.
- Stöcklin, E., M. Wissler, R. Moriggl und B. Groner (1997). "Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6708-16.
- Strahl, B. D. und C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**(6765): 41-5.
- Strausberg, R. L., E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altschul, B. Zeeberg, K. H. Buetow, C. F. Schaefer, N. K. Bhat, R. F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S. I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A. A. Farmer, G. M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, M. J. Brownstein, T. B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S. S. Raha, N. A. Loquellano, G. J. Peters, R. D. Abramson, S. J. Mullahy, S. A. Bosak, P. J. McEwan, K. J. McKernan, J. A. Malek, P. H. Gunaratne, S. Richards, K. C. Worley, S. Hale, A. M. Garcia, L. J. Gay, S. W. Hulyk, D. K. Villalon, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, X. Lu, R. A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Kettman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. C. Young, Y. Shevchenko, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, J. W. Touchman, E. D. Green, M. C. Dickson, A. C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, Y. S. Butterfield, M. I. Krzywinski, U. Skalska, D. E. Smailus, A. Schnerch, J. E. Schein, S. J. Jones und M. A. Marra (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16899-903.
- Stromstedt, P. E., L. Poellinger, J. A. Gustafsson und J. Carlstedt-Duke (1991). "The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation." *Mol Cell Biol* **11**(6): 3379-83.
- Struhl, K. (1998). "Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms." *Genes Dev* **12**(5): 599-606.
- Subramaniam, N., W. Cairns und S. Okret (1997). "Studies on the mechanism of glucocorticoid-

- mediated repression from a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene." *DNA Cell Biol* **16**(2): 153-63.
- Subramaniam, N., W. Cairns und S. Okret (1998). "Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1." *J Biol Chem* **273**(36): 23567-74.
- Subramaniam, N., E. Treuter und S. Okret (1999). "Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids." *J Biol Chem* **274**(25): 18121-7.
- Suda, T., F. Tozawa, M. Yamada, T. Ushiyama, N. Tomori, T. Sumitomo, Y. Nakagami, H. Demura und K. Shizume (1988). "Effects of corticotropin-releasing hormone and dexamethasone on proopiomelanocortin messenger RNA level in human corticotroph adenoma cells in vitro." *J Clin Invest* **82**(1): 110-4.
- Sun, J. M., H. Y. Chen, M. Moniwa, D. W. Litchfield, E. Seto und J. R. Davie (2002). "The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2." *J Biol Chem* **277**(39): 35783-6.
- Szpirer, C., J. Szpirer, M. Riviere, P. Van Vooren, G. Huez, V. Kruys und C. Gueydan (1999). "Localization of the rat genes encoding the RNA binding protein TIAR (Tial1) and the integrin beta1 subunit (Itgb1): evidence for multiple homology relationships between the rat chromosome 19q12 region and the human genome." *Cytogenet Cell Genet* **87**(1-2): 106-7.
- Tago, K., F. Tsukahara, M. Naruse, T. Yoshioka und K. Takano (2004). "Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90." *Mol Cell Endocrinol* **213**(2): 131-8.
- Takahashi, I., H. Miyaji, T. Yoshida, S. Sato und T. Mizukami (1996). "Selective inhibition of IL-2 gene expression by trichostatin A, a potent inhibitor of mammalian histone deacetylase." *J Antibiot (Tokyo)* **49**(5): 453-7.
- Teyssier, C., K. Belguise, F. Galtier, V. Cavailles und D. Chalbos (2003). "Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect." *Mol Endocrinol* **17**(2): 287-99.
- Therrien, M. und J. Drouin (1991). "Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements." *Mol Cell Biol* **11**(7): 3492-503.
- Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam und J. F. Ponte (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." *Ann N Y Acad Sci* **983**: 84-100.
- Toft, D. J., S. B. Rosenberg, G. Bergers, O. Volpert und D. I. Linzer (2001). "Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13055-9.
- Tollet-Egnell, P., A. Flores-Morales, A. Stavreus-Evers, L. Sahlin und G. Norstedt (1999). "Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat." *Endocrinology* **140**(8): 3693-704.
- Tonko, M., M. J. Ausserlechner, D. Bernhard, A. Helmberg und R. Kofler (2001). "Gene expression profiles of proliferating vs. G1/G0 arrested human leukemia cells suggest a mechanism for glucocorticoid-induced apoptosis." *Faseb J* **15**(3): 693-9.
- Trapp, T. und F. Holsboer (1996). "Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action." *Trends Pharmacol Sci* **17**(4): 145-9.
- Turner, B. M. (1993). "Decoding the nucleosome." *Cell* **75**(1): 5-8.
- Umesono, K. und R. M. Evans (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." *Cell* **57**(7): 1139-46.
- Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson und R. M. Evans (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." *Cell* **65**(7): 1255-66.
- Väänänen, K. H. und P. L. Härkönen (2002). "Bone effects of glucocorticoid therapy." *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 55-64.
- Vaux, D. L. und S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." *Cell* **96**(2): 245-54.

- Vidal, M. und R. F. Gaber (1991). "RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **11**(12): 6317-27.
- Vogelstein, B., D. Lane und A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* **408**(6810): 307-10.
- Wagner, R. L., J. W. Apriletti, M. E. McGrath, B. L. West, J. D. Baxter und R. J. Fletterick (1995). "A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor." *Nature* **378**(6558): 690-7.
- Wan, Y. und S. K. Nordeen (2002). "Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **16**(6): 1204-14.
- Wang, Q., J. A. Blackford, Jr., L. N. Song, Y. Huang, S. Cho und S. S. Simons, Jr. (2004). "Equilibrium interactions of corepressors and coactivators with agonist and antagonist complexes of glucocorticoid receptors." *Mol Endocrinol* **18**(6): 1376-95.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins und S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." *Nature* **356**(6367): 314-7.
- Watkins, R. E., J. M. Maglich, L. B. Moore, G. B. Wisely, S. M. Noble, P. R. Davis-Searles, M. H. Lambert, S. A. Kliewer und M. R. Redinbo (2003). "2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin." *Biochemistry* **42**(6): 1430-8.
- Webster, J. I., L. Tonelli und E. M. Sternberg (2002). "Neuroendocrine regulation of immunity." *Annu Rev Immunol* **20**: 125-63.
- Wei, L. N., M. Farooqui und X. Hu (2001). "Ligand-dependent formation of retinoid receptors, receptor-interacting protein 140 (RIP140), and histone deacetylase complex is mediated by a novel receptor-interacting motif of RIP140." *J Biol Chem* **276**(19): 16107-12.
- Wei, L. N., X. Hu, D. Chandra, E. Seto und M. Farooqui (2000). "Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing." *J Biol Chem* **275**(52): 40782-7.
- Weinberger, C., S. M. Hollenberg, M. G. Rosenfeld und R. M. Evans (1985). "Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product." *Nature* **318**(6047): 670-2.
- Westin, S., R. Kurokawa, R. T. Nolte, G. B. Wisely, E. M. McNerney, D. W. Rose, M. V. Milburn, M. G. Rosenfeld und C. K. Glass (1998). "Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators." *Nature* **395**(6698): 199-202.
- Windahl, S. H., E. Treuter, J. Ford, J. Zilliacus, J. A. Gustafsson und I. J. McEwan (1999). "The nuclear-receptor interacting protein (RIP) 140 binds to the human glucocorticoid receptor and modulates hormone-dependent transactivation." *J Steroid Biochem Mol Biol* **71**(3-4): 93-102.
- Wolffe, A. P. und J. J. Hayes (1999). "Chromatin disruption and modification." *Nucleic Acids Res* **27**(3): 711-20.
- Won, J., J. Yim und T. K. Kim (2002). "Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells." *J Biol Chem* **277**(41): 38230-8.
- Wurtz, J. M., W. Bourguet, J. P. Renaud, V. Vivat, P. Chambon, D. Moras und H. Gronemeyer (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." *Nat Struct Biol* **3**(1): 87-94.
- Xu, M., K. J. Modarress, J. E. Meeker und S. S. Simons, Jr. (1999). "Steroid-induced conformational changes of rat glucocorticoid receptor cause altered trypsin cleavage of the putative helix 6 in the ligand binding domain." *Mol Cell Endocrinol* **155**(1-2): 85-100.
- Yang, Y., M. Mercep, C. F. Ware und J. D. Ashwell (1995). "Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids." *J Exp Med* **181**(5): 1673-82.
- Yao, T. P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully und D. M. Livingston (1996). "The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10626-31.
- Yeh, S. und C. Chang (1996). "Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5517-21.
- Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." *Physiol Rev* **81**(3): 1097-142.

- Yoon, H. G., D. W. Chan, Z. Q. Huang, J. Li, J. D. Fondell, J. Qin und J. Wong (2003). "Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1." *Embo J* **22**(6): 1336-46.
- Yoon, J. C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C. R. Kahn, D. K. Granner, C. B. Newgard und B. M. Spiegelman (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 131-8.
- Zegerman, P., B. Canas, D. Pappin und T. Kouzarides (2002). "Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex." *J Biol Chem* **277**(14): 11621-4.
- Zeiner, M. und U. Gehring (1995). "A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11465-9.
- Zhang, G., L. Zhang und G. W. Duff (1997). "A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene." *DNA Cell Biol* **16**(2): 145-52.
- Zhang, J., M. Kalkum, B. T. Chait und R. G. Roeder (2002). "The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2." *Mol Cell* **9**(3): 611-23.
- Zhang, X. K., J. M. Dong und J. F. Chiu (1991). "Regulation of alpha-fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site." *J Biol Chem* **266**(13): 8248-54.
- Zhang, Y. und M. L. Dufau (2002). "Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex." *J Biol Chem* **277**(36): 33431-8.
- Zhu, X. G., J. A. Hanover, G. L. Hager und S. Y. Cheng (1998). "Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera." *J Biol Chem* **273**(42): 27058-63.
- Zilliacus, J., J. Carlstedt-Duke, J. A. Gustafsson und A. P. Wright (1994). "Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4175-9.

8. Veröffentlichungen

Baumann, S., A. Dostert, N. Novac, A. Bauer, W. Schmid, S. Fas, A. Krueger, T. Heinzl, S. Kirchhoff, G. Schütz und P. Krammer (2004). Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA dependent repression of the CD95-ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. Manuskript in Vorbereitung.

Dostert, A., Heinzl, T. (2002). DNA-dependent cofactor selectivity of the glucocorticoid receptor. *Ernst Schering Res Found Workshop*(40): 279-95.

Dostert, A., Heinzl, T (2004). Negative Glucocorticoid Receptor Response Elements and their Role in Glucocorticoid Action. *Curr Pharm Des*, in press.

Schulz, M, M. Eggert, A. Baniahmad, A. Dostert, T. Heinzl und R. Renkawitz (2002). RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem* 277(29): 26238-43.

Danksagungen

Als ich im Oktober 1995 mein Studium der Lebensmittelchemie in Kaiserslautern begonnen habe, bekamen wir ein Erstsemester-Infoheft mit dem Namen 'Der Kolbenfresser' in die Hand gedrückt. (Es geht die Geschichte vom Kolbenfresser herum, der sich von den Geräuschen zerbrechender Erlenmeyerkolben und Glaswaren ernährt.) In diesem Heft stand unter anderem folgender Satz:

Das Wichtigste von AC1 bis Promotion ist:

Ruhe bewahren und Schock bekämpfen!

Mittlerweile kann ich diese Aussage absolut nachvollziehen und möchte allen danken, die mir bei der Schockbekämpfung zur Seite gestanden haben.

Zunächst einmal möchte ich meiner Mutter dafür danken, dass sie mich auf meinem Weg immer unterstützt und gefördert hat. Jahre nach meinem Studienbeginn hat sie mir anvertraut, dass sie nach meinem ersten Semester sicher war, mich bald wieder zu Hause zu haben. Liebe Mama, ich möchte Dir dafür danken, dass Du mich das nie hast spüren lassen und dass Du immer für mich da warst! Diese Arbeit wäre ohne Dich nicht zustande gekommen.

Ich danke meinem Chef PD Dr. Thorsten Heinzel für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die intensive Betreuung und für die vielen Ideen und Anregungen. Lieber Thorsten, ich danke Dir für Deine Geduld, die Du nicht nur an den Skihängen der Rocky Mountains bewiesen hast!

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk bedanken, in dessen Arbeitsgruppe ich bereits meine Diplomarbeit durchführen durfte und der nun auch die Betreuung meiner Dissertation durch die Technische Universität Kaiserslautern übernommen hat.

Forschung lebt und profitiert von der Kooperation. Deshalb möchte ich all meinen Kooperationspartnern herzlich danken. Dazu gehören Dr. Sven Baumann (ehemals DKFZ, jetzt MPI Berlin) und Prof. Dr. Peter Krammer (DKFZ), Dr. Martin Schulz und Dr. Martin Eggert (beide ehemals Universität Gießen, jetzt Klinikum Rostock), Prof. Dr. Günther Schütz und Dr. Wolfgang Schmid (DKFZ). Auch möchte ich meinen Kooperationspartnern von Boehringer Ingelheim danken, Dr. Frank Kalkbrenner, Dr. Stefan Kreideweiss (beide BI Biberach) und Dr. ChenKon Shih (BI Ridgefield, USA). Sie haben es mir ermöglicht, einen Eindruck von den Herausforderungen der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung zu bekommen.

Ich möchte meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern der Georg-Speyer-Hauses für die schöne Arbeitsatmosphäre danken. Ich danke Annemarie Schimpf fürs Zuhören und für ihre Geduld, Jens Tiefenbach für die Einführung in die Kunst der Diplomatie (ich weiss jetzt dass

es sowas gibt und werde mir Mühe geben es zu lernen) und für die vielen Gespräche sowohl privater als auch wissenschaftlicher Natur. Außerdem danke ich Miryam Ducasse dafür, dass sie immer wieder positiv auf alle Menschen zugeht. Ich danke Oliver Krämer für die beeindruckende Einführung in die Kunst der Kriegsführung. Ich danke außerdem Maresa Eck, Silvia Koob und Klaus Lehmen für viele nette Gespräche.

Für ihre Unterstützung bei Fragen zur Berufswahl und bei der Orientierung im Dschungel der Möglichkeiten danke ich meiner Mentorin Dr. Doris Wittneben (Mannheim) und den Frauen des BPW (Business and Professional Women e.V.) -Clubs Frankfurt am Main.

Dann muss ich noch ein zweites Mal Sven Baumann danken, der mich auf die Idee gebracht hat, WingTsun zu lernen. Ich danke außerdem meinem Sifu und meinen Si-Hings dafür, dass sie mich in diese spannende Kampfkunst einweisen und für die vielen Dinge, die ich bereits gelernt habe.

Ich danke den Mitgliedern meiner ehemaligen Jazz-Band ‚Dr. Rohr‘ und meiner jetzigen Band ‚Midnight Moon‘ für viele schöne Proben und viele Auftritte (gute wie schlechte). Bei Euch habe ich gelernt, mich auf meinem Instrument auszudrücken und einfach zu spielen! (nicht, dass das *immer* funktionieren würde...)

Auch möchte ich meinen Frankfurter Freunden dafür danken, dass ich hier eine so schöne Zeit hatte. Dazu gehört meine beste Freundin Suse, von der ich die Kunst des Flamenco lernen durfte und mit der ich viel Zeit in im finnischen Saunaritual verbracht habe. Auch danke ich Susi und der ganzen Flamenco-Clique, vor allem dem ehemaligen Sigueriya-Kurs (der berühmte Mittwochskurs!) dafür, dass wir uns immer wieder getroffen haben und schöne Fiestas zusammen gefeiert haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Thomas Wilting dafür bedanken, dass er all meine Computer immer wieder ans Laufen gebracht hat, für so manchen Notfalleinsatz und dafür, dass er mir immer ein guter Freund war und ist. Auch hat er mich als Verbindungsmann zwischen FFM und KL bei den ganzen organisatorischen Dingen im Rahmen meiner Promotion unterstützt.

Ich danke außerdem allen, die ich hier vergessen habe für ihre Nachsicht.

Lebenslauf

Persönlichen Daten

Anja Dostert	geboren am 18.08.1975
Melibocusstraße 68	in Saarburg
60528 Frankfurt am Main	ledig

Studium

Juni 2000 bis September 2004	Promotion im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thorsten Heinzel
Oktober 1995 bis März 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Kaiserslautern
24.10.1997	Vordiplom (staatl. Vorprüfung)
23.09.1999	Diplomprüfungen
31.03.2000	Abschluß der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Schulbildung

1982-1986	Grundschule Tawern
1986-1995	Gymnasium Saarburg

Auslandsaufenthalte

30.07.-30.09.1998	Praktikum in der Abteilung für physikalische Chemie an der Universität Åbo Akademi in Turku/Finnland
20.08.-26.08.2001	Posterpräsentation auf einem wissenschaftlichen Kongress in Mont St. Odile/Frankreich
28.02.-05.03.2004	Posterpräsentation auf einem wissenschaftlichen Kongress in Keystone, Colorado/USA (Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft)

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Heinzel im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, Technische Universität Kaiserslautern, selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Frankfurt, 13.08.2004

Anja Dostert