



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7108

**Das Lim-Domänen-Protein
Trip6 ist essentiell für den
Crosstalk der Transkriptions-
faktoren GR, AP-1 und NF- κ B**

C. Heilbock

Institut für Toxikologie und Genetik

Mai 2005

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft
Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7108

Das Lim-Domänen-Protein Trip6 ist essentiell für den Crosstalk der Transkriptionsfaktoren GR, AP-1 und NF- κ B

Christine Heilbock
Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2005

Impressum der Print-Ausgabe:

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

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

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071084

**Das Lim-Domänen-Protein Trip6
ist essentiell für den Crosstalk der Transkriptionsfaktoren
GR, AP-1 und NF- κ B**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin
Christine Heilbock

aus

Waldshut-Tiengen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes

1. Gutachter: PD Dr. Jonathan Sleeman

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Herrlich

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2005

Zusammenfassung

Glukokortikoide entfalten ihre vielfältige Wirkung nach Bindung an den Glukokortikoidrezeptor (GR). Der GR transloziert nach Aktivierung in den Zellkern und reguliert die Genexpression über zwei verschiedene Mechanismen. Einerseits durch die Transaktivierung. Hierbei dimerisieren die Rezeptormoleküle und binden an spezifische DNA-Sequenzabschnitte (GREs) im Promotorbereich von GR-regulierten Genen. Andererseits moduliert der monomere Rezeptor durch Protein-Protein-Wechselwirkung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B. Diese Funktion wird Transrepression genannt.

Die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren ist ein wichtiger Regulator für die transkriptionelle Aktivität und wird als *crossstalk* bezeichnet. Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B aktivieren zahlreiche Gene, die in Entzündungsreaktionen involviert sind. Der Transkriptionsfaktor GR hemmt diese Aktivität. Darauf beruht ein Großteil der immunsuppressiven Wirkungen von Glukokortikoiden und findet eine breite therapeutische Anwendung. Wie dieser Mechanismus funktioniert, ist bisher nicht verstanden.

In dieser Arbeit gelang die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung von nTrip6, einer kernspezifischen Isoform des fokalen Adhäsionsmoleküls Trip6. Diese Isoform interagiert mit allen am *crossstalk* beteiligten Proteinen und besitzt eine Koaktivator-ähnliche Funktion für AP-1 und NF- κ B. Zusätzlich wirkt nTrip6 aber auch als molekulare Plattform für den reprimierenden Transkriptionsfaktor GR. Der GR assoziiert über nTrip6 an den Promotor und vermittelt dort seine Transrepressionsfunktion. Ohne nTrip6 kann der GR nicht am Promotor binden und es findet keine Transrepression statt. Es wurde eine GR-Domäne entdeckt, die für diese Interaktion zwischen nTrip6 und dem GR unerlässlich ist. Mutation dieser Domäne sollte die Interaktion mit nTrip6 und damit die Transrepression verhindern und wäre somit zur genaueren Untersuchung der Transrepressionsfunktion des GR sehr hilfreich.

nTrip6 stellt eine neue Art von Transkriptions-Kofaktor dar, die das Zusammenwirken verschiedener Multiprotein-Komplexe am Promotor von Zielgenen vermittelt. Dieses Protein ermöglicht es dem Promotor auf verschiedene Signale zu reagieren und somit entweder aktivierend oder reprimierend zu wirken.

The Lim-Domain protein Trip6 is essential for the crosstalk of GR, AP-1 and NF- κ B

The action of the GR after binding glucocorticoids has a multitude of effects. The GR translocates to the nucleus and regulates gene expression via two different mechanisms. One mechanism, known as transactivation, occurs through dimerisation of the receptor molecule and subsequent binding to specific DNA sequences (GREs) in promoter regions of GR regulated genes. The second mechanism, known as transrepression, involves the monomeric receptor through protein-protein interactions, modulating the activation of transcription factors such as AP-1 and NF- κ B.

The interaction between transcription factors is an important „brake mechanism“ for transcriptional regulation and is known as crosstalk. AP-1 and NF- κ B activate several genes involved in the inflammatory process. The transcription factor GR controls the „brake mechanism“ and reduces AP-1 and NF- κ B activation and consequently represses the immune response. Due to the immunosuppressive effect of glucocorticoids it is often used as a therapeutic agent. However, the mechanism of GR transrepression is not known.

This thesis involved the identification and functional characterisation of nTrip6, a nuclear specific isoform of the focal adhesion molecule Trip6. This nuclear isoform interacts with all crosstalk proteins and has a coactivator-like function for AP-1 and NF- κ B. In addition nTrip6 is also a molecular platform for the transrepression function of the GR. The GR associates through nTrip6 at the promoter and mediates its transrepression function. Without nTrip6 the GR can not bind the promoter and can not transrepress.

The GR-domain for interaction between nTrip6 and GR needed for transrepression was discovered. Mutations in this domain should inhibit nTrip6 interaction and consequently block transrepression. Such a mutant would be useful in dissecting the transrepression mechanism of GR.

nTrip6 also works as a coactivator for GR in transactivation and mediates the binding of repressing factors. This means nTrip6 is a novel transcriptional cofactor combining different multiprotein complexes at promoters of target genes. nTrip6 integrates activating and repressing signals at the promoter of target genes.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Der GR	3
1.2	Die Struktur des Glukokortikoidrezeptors (GR)	4
1.3	Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor	5
1.3.1	Die Transaktivierungsfunktion des GR.....	5
1.3.2	Die Transrepressions-Funktion des GR	7
1.3.2.1	Repression durch Hemmung der Signaltransduktion.....	7
1.3.2.2	Repression durch Synthese eines Inhibitors.....	8
1.3.2.3	Repression über GR-Bindestellen in den Promotoren der Zielgene	10
1.3.2.4	Repression durch Interaktion des GR mit dem positiv regulierenden Transkriptionsfaktor ohne GR-DNA-Bindung	10
1.4	AP-1-Repression durch den GR bedarf zusätzlicher Faktoren	12
1.4.1	Zellspezifität.....	13
1.4.2	Rekonstituierbarkeit in Hefe	13
1.4.3	Kristallisation.....	13
1.5	Suche nach zusätzlichen Faktoren, die möglicherweise bei der Repression von AP-1 durch den GR benötigt werden	13
1.6	Trip6	14
1.7	Zielsetzung	16
2	<i>Material und Methoden</i>	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen.....	17
2.1.2	Kits	19
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.4	Geräte.....	19
2.1.5	Enzyme	20
2.1.6	Radiochemikalien	20
2.1.7	Bakterienstämme	21
2.1.8	Kulturmedien für Bakterien.....	21
2.1.9	Medien für E.coli Kulturen.....	21
2.1.10	Zelllinien und Transfektionsreagenzien.....	22
2.1.11	Plasmide.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.1.11.1	Expressionsplasmide	22
2.1.11.2	Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen.....	26
2.1.11.3	Plasmide zur <i>in vitro</i> Translation.....	27
2.1.11.4	Reporter.....	29
2.1.11.5	Proben für die <i>Northern</i> -Hybridisierung.....	30
2.1.12	Oligonukleotide.....	30
2.1.12.1	Zur Verwendung in der Chromatin IP	30
2.1.12.2	Zur Verwendung in siRNA.....	31
2.1.13	Antikörper.....	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur und Transfektionsmethoden	33
2.2.1.1	Kulturbedingungen.....	33
2.2.1.2	Passagieren von Zellen	33
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
2.2.1.4	Induzieren von Zellen	34
2.2.1.5	Transiente Transfektionen von Cos7-Zellen mit FUGENE zur Messung der Reportergen- Aktivität.....	34
2.2.1.6	Transiente Transfektionen von HeLa-Zellen mit Lipofektamin zur Messung der Reportergen- Aktivität.....	34
2.2.1.7	Transiente Transfektionen zum Ausschalten (<i>silencing</i>) von Zielgenen in HeLa-Zellen mit Hilfe von si-Oligomeren	35
2.2.1.8	Reporter-Gen-Aktivität – Messung der <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferaseaktivität	35
2.2.2	DNA-Methoden.....	36
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.2.2	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	37
2.2.2.3	Fällung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
2.2.2.6	Plasmid-DNA-Mini-Präparation nach der LiCl-Methode	38
2.2.2.7	Plasmid-DNA-Maxi-Präparation	38
2.2.2.8	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	39
2.2.2.9	Dephosphorylierung von DNA.....	39
2.2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	40
2.2.2.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (E. coli).....	40
2.2.2.12	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	41
2.2.2.13	Klonierung mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.14	Sub-Klonierung in TOPO-Vektor	41
2.2.2.15	DNA-Sequenzierung mit ³² P markierten Didesoxy-NTPs:	42
2.2.2.16	Kommerzielle Sequenzierungen bei der Firma GATC.....	42
2.2.3	RNA.....	43
2.2.3.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	43
2.2.3.2	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.3.3	Northernblot.....	44
2.2.3.4	Radioaktive Markierung.....	44
2.2.3.5	Northernblot-Hybridisierung	45
2.2.3.6	Detektion von radioaktiven Signalen	45
2.2.4	Protein-Methoden	46
2.2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	46
2.2.4.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	46
2.2.4.3	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	47
2.2.4.4	Immunoblot-Analyse von Proteinen („Westernblot“).....	47
2.2.4.5	Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten.....	48
2.2.5	Analyse von Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionen.....	48
2.2.5.1	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen.....	48
2.2.5.1.1	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	48
2.2.5.1.2	<i>In vitro</i> Translation.....	50
2.2.5.1.3	GST-Fusionsprotein-Interaktionstest.....	50
2.2.5.2	Nachweis von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen mit Hilfe der Chromatin- Immunopräzipitation.....	51
2.2.5.2.1	Vorbereitung der Zellen zur Chromatin-Immunopräzipitation.....	51
2.2.5.2.2	Formaldehyd-Fixierung von DNA-assoziierten Proteinen.....	51
2.2.5.2.3	Sonifizieren von Chromatin	52
2.2.5.2.4	Chromatin-Immunopräzipitation	52
2.2.5.2.5	Lösen der Protein-DNA-Komplexe (<i>decrosslinking</i>) und Aufreinigung der DNA.....	53
2.2.5.2.6	Nachweis mittels PCR.....	54
2.2.5.2.7	Quantifizierung der PCR-Produkte.....	54
2.2.5.3	Chromatin-Doppel-IP.....	54
2.2.5.4	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der SPOT™ -Technologie.....	55
2.2.5.4.1	Bestimmung der Interaktionsoberfläche durch 3er-Verschiebung der Aminosäuren.....	55
2.2.5.4.2	Bestimmung einzelner interagierender Aminosäuren durch den Alanin-Scan.....	56

3	Ergebnisse	57
3.1	Subzelluläre Lokalisation von Trip6	57
3.2	Trip6-Interaktionsstudien	61
3.2.1	Trip6 bindet spezifisch über einzelne Lim-Domänen an GR, AP-1 und NF- κ B	62
3.2.2	Ohne den Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 3 kann Trip6 nicht mehr an den GR binden, dies beeinflusst nicht die Interaktion mit AP-1 oder NF- κ B.....	66
3.2.3	Ohne den Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 1 kann Trip6 nicht mehr an AP-1 oder NF- κ B binden, dies beeinflusst nicht die Bindung an den GR	68
3.3	Promotorstudien	70
3.3.1	nTrip6 ist unter aktivierenden und reprimierenden Bedingungen am Promotor von NF- κ B-regulierten Zielgenen lokalisiert.....	70
3.3.2	nTrip6 ist unter aktivierenden und reprimierenden Bedingungen am Promotor von AP-1-regulierten Zielgenen lokalisiert.....	74
3.3.3	Der Komplex aus cFos, nTrip6 und GR befindet sich auf ein und demselben Promotormolekül	75
3.4	Funktion von Trip6	77
3.4.1	Der Proteingehalt von Trip6 kann spezifisch reduziert werden	79
3.4.1.1	Ohne Trip6 kann keine GR-vermittelte Repression von AP-1- und NF- κ B- Zielgenen mehr stattfinden	80
3.4.2	Ohne nTrip6 kann der GR nicht mehr an den Promotor binden	82
3.5	Interaktion von Trip6 mit den Mitgliedern der AP-1- bzw. NF-κB- Familien	84
3.5.1	Trip6 interagiert spezifisch mit Fos-Familienmitgliedern.....	85
3.5.2	Trip6 interagiert nicht mit Jun-Familienmitgliedern oder ATF2.....	86
3.5.3	Trip6 interagiert spezifisch mit einigen Mitgliedern der NF- κ B-Familie	87
3.6	Zusätzliche Faktoren sind nötig	89
3.6.1	GR und Trip6 reichen zur Repression nicht aus	89
3.7	Der Effekt von Trip6 auf die Transaktivierungsfunktion des GR	93
3.7.1	Trip6 ist ein Koaktivator des GR.....	93
3.7.2	GR-Transaktivierung kann durch cFos reprimiert werden	95
3.7.3	Trip6 mit mutierter Domäne Lim 1 zerstört die Repressionswirkung von cFos auf GR-Transaktivierung.....	97
3.7.4	Trip6 mit mutierter Domäne Lim 3 beeinflusst nicht die Repressionswirkung von cFos auf GR-Transaktivierung.....	100
3.8	Promotorstudien der GR-Transaktivierung	102

3.9	Der GR interagiert mit Trip6 über den N-terminalen Bereich seiner DBD.....	105
3.10	Der GR interagiert mit Trip6 über einen Bereich zwischen AS 406-420.....	107
3.11	Das Lysin an Position AS 419 des GR wird benötigt zur Interaktion des GR mit Trip6.....	109
3.12	Das Lysin unmittelbar vor dem 1. Zinkfinger-koordinierenden Cystein ist hochkonserviert in der Familie der nukleären Rezeptoren.....	111
3.13	Das Lysin kurz vor dem Zinkfinger allein reicht nicht aus zur Interaktion mit Trip6..	112
3.14	Trip6-Bindung und Repressionsfähigkeit hängen zusammen.....	113
4	<i>Diskussion</i>	115
4.1	nTrip6 ist ein nukleäres Protein.....	115
4.2	nTrip6 besitzt eine Koaktivator-ähnliche Funktion für AP-1, NF- κB und GR.....	117
4.3	nTrip6 ist zur Transrepression unerlässlich.....	120
4.4	Untersuchung von GR-Domänen.....	122
4.5	Physiologische Bedeutung.....	125
5	<i>Literatur</i>	127
6	<i>Abkürzungen</i>	139
7	<i>Lebenslauf</i>	143
8	<i>Danksagung</i>	145

1 Einleitung

Die Glukokortikoide gehören zu den Steroidhormonen. Dies sind Lipid-verwandte Moleküle mit einem Cyclopentanperhydrophenantren-Grundgerüst, dessen Biosynthesegrundstein das Cholesterin ist. Zur Gruppe der Steroidhormone gehören die Kortikosteroide, die in die zwei Haupttypen der Glukokortikoide (Cortisol, Corticosteron) und Mineralkortikoide (Aldosteron) eingeteilt werden, sowie die Sexualhormone (weiblich: Östrogen, Progesteron; männlich: Testosteron), das Calcitriol (1,25--Dihydroxy-Vitamin D₃) und auch die Häutungshormone der Arthropoden (Ecdyson, Ecdysteron).

Die Glukokortikoide werden in der Nebenniere gebildet und wirken hauptsächlich auf den Intermediärstoffwechsel. Sie stimulieren u. a. die Glukoneogenese, steigern den Fettabbau, sorgen für die Freisetzung von Fettsäuren und stimulieren die Protein- und Nukleinsäuresynthese in der Leber. Glukokortikoide beeinflussen außerdem die Entwicklung und Reifung der embryonalen Lunge und Nebennieren (Cole et al., 1995). Im adulten Organismus haben sie Einfluss auf das Nerven- und Immunsystem. Als Reaktion auf Langzeitstress kommt es zu einer Ausschüttung von Glukokortikoiden. Diese hemmen die Aktivierung, Rekrutierung und Migration von Lymphozyten und sind in der Lage Immun- und Entzündungsreaktionen zu unterdrücken (Munck and Holbrook, 1984; Munck and Naray-Fejes-Toth, 1994). Physiologisch soll dies möglicherweise die körpereigene Abwehr vor einer Überreaktion während einer Infektion oder Verletzung schützen.

1948 konnte zum ersten Mal ein Glukokortikoid erfolgreich in der Behandlung von rheumatischer Arthritis eingesetzt werden. Seither gehören Glukokortikoide zusätzlich zur Standardtherapie in der Behandlung von akuten und chronischen Entzündungen, Allergien, Asthma und Erkrankungen des Kollagen-Gewebes (Boumpas et al., 1993; Cutroneo and Sterling, 1986). Ausserdem werden sie eingesetzt zur Immunsuppression, z.B. bei Organtransplantationen und in der Krebstherapie. Damit gehören Glukokortikoide zu den meistgenutzten immunsuppressiven Medikamenten. Laut Statistik wurden allein 1995 in Deutschland 6,6 Millionen Rezepte für Glukokortikoide ausgestellt (Schwabe, 1995).

Die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide basiert auf der Hemmung der Zytokin- und Chemokinsynthese und der Repression von Genen für Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die bei der Aktivierung, Rekrutierung und Migration von Lymphozyten eine Rolle spielen (Barnes, 1998; Barnes and Karin, 1997; Cato et al., 1992; Wade et al., 1995).

Glukokortikoide wirken toxisch, da sie z. B. in T-Lymphozyten Apoptose auslösen. Dieser Effekt wird wirkungsvoll eingesetzt in der Behandlung von T-Lymphomen, Leukämie oder Brustkrebs (Ihle, 1989; Karin and Saatcioglu, 1997).

Leider kommt es bei Langzeitanwendung von Glukokortikoiden zu zahlreichen unerwünschten, zum Teil sogar lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Zu diesen gehören u. a. Haarausfall, Pergamenthaut, „Steroid-Psychose“, Diabetes, Osteoporose, Hypertonie, Stammfettsucht, „Vollmond“-Gesicht, erhöhte Infektanfälligkeit und verzögerte Wundheilung (Boumpas et al., 1993; Googwin, 1994).

Zusammengenommen besteht der limitierende Faktor der erfolgreichen Glukokortikoid-Therapie im Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen. Aus diesem Grund ist es unbedingt erforderlich neue synthetische Glukokortikoid-Analoga zu entwickeln, die möglichst frei von diesen Nebenwirkungen sind (Topert, 1988). Dafür ist es notwendig die molekulare Wirkungsweise der Glukokortikoide genau zu untersuchen.

Glukokortikoide vermitteln ihre Wirkung über zwei verschiedene nukleäre Rezeptoren, den Glukokortikoid-Rezeptor (GR), sowie den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR). Der MR bindet Glukokortikoide mit höherer Affinität als der GR. Allerdings wird der GR in fast allen Zelltypen exprimiert, während der MR nur in Epithelzellen von Niere, Darm und Speicheldrüse sowie in Zellen von Gehirn und Herz vertreten ist (Reichardt and Schutz, 1998). Aktivierung von MR führt zum Na⁺-Rückhalt durch Aktivierung epithelialer Na⁺-Kanäle. Dies führt zu einem höheren Blutdruck (Lifton et al., 2001).

Moderne, synthetische Glukokortikoide aktivieren jedoch nur noch den GR.

1.1 Der GR

Der GR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der in Abwesenheit seines Liganden inaktiv im Zytoplasma der Zelle vorliegt. Er ist gebunden an einen Multi-Proteinkomplex zusammen mit Hitzeschockproteinen wie Hsp90, p60/Hop, Hsp70 und Hsp40 (Dittmar and Pratt, 1997; Schneikert et al., 1999). Glukokortikoide, die durch die Zellmembran diffundieren, binden und aktivieren damit den GR. Dieser dissoziiert vom Multi-Proteinkomplex und damit erfolgt eine Demaskierung von nukleären Lokalisationssignalen (NLS). Dies befähigt den GR zur Translokation in den Zellkern. Es wurde gezeigt, dass möglicherweise keine vollständige Trennung des GR vom Multi-Proteinkomplex erfolgt. Entweder wandern einige der Hitzeschockproteine mit dem GR in den Zellkern oder sie besitzen im Kern nukleäre Isoformen, da Hsp90- und Hsp70-GR-Komplexe sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden sind. Ihre Funktion ist jedoch noch ungeklärt (DeFranco et al., 1998; Kang et al., 1999).

Neben dem Glukokortikoidrezeptor gehören auch die Rezeptoren für Mineralkortikoide, Progesteron, Androgene, Östrogene, Vitamin D3, Thyroidhormone und Retinsäure zu dieser Untergruppe von Transkriptionsfaktoren. Außerdem existieren sogenannte verwaiste Rezeptoren (*orphan receptors*), deren Liganden noch unbekannt sind (Mangelsdorf and Evans, 1995; Mangelsdorf et al., 1995). Alle Mitglieder dieser Familie zeigen eine charakteristische Domänenstruktur, die hier am Beispiel des GR näher erklärt werden soll (Beato, 1989; Beato et al., 1995; Cato et al., 1992; Evans, 1988).

1.2 Die Struktur des Glukokortikoidrezeptors (GR)

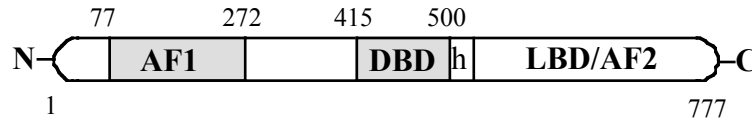


Abb.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Steroidhormon-Rezeptoren am Beispiel des menschlichen Glukokortikoid-Rezeptors

Die funktionelle Beschreibung der einzelnen Domänen erfolgt im Text. N, Amino-Terminus; C, Carboxy-Terminus; AF-1 und AF-2, Aktivierungsfunktion 1 und 2; DBD, DNA-Bindedomäne; h, *hinge*-Region; LBD, Ligandenbindedomäne. Die Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen.

Die N-terminale Transaktivierungsdomäne τ_1 ist beteiligt an der Aktivierung der Transkription durch den Rezeptor. Sie wird als Aktivierungsfunktion AF-1 bezeichnet und ist zwischen den Aminosäurepositionen 77 und 272 lokalisiert.

Zentral liegt die DNA-Bindedomäne (DBD). Sie ist innerhalb der Steroidrezeptor-Familie hoch konserviert und besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven. Jedes Zinkion ist mit vier Cysteinen koordinativ verknüpft (Freedman et al., 1988). Eine kurze Aminosäuresequenz am Ende des N-terminalen Zinkfingers ist für die spezifische Bindung an die DNA verantwortlich, während ein Teil am Anfang des C-terminalen Zinkfingers für die Dimerisierung von GR-Molekülen zuständig ist (Dahlman-Wright et al., 1991; Umesono and Evans, 1989; Zilliacus et al., 1995). Die *hinge*-Region verbindet die DBD mit der Liganden-Bindedomäne (LBD). Sie enthält Sequenzen, die zur Translokation des Rezeptors in den Kern benötigt werden (Picard and Yamamoto, 1987).

C-terminal liegt die Ligandenbindedomäne (LBD), an die das Steroidhormon binden kann (Carlstedt-Duke et al., 1988). Diese Domäne ist durch eine an die DBD anschließende Transaktivierungsdomäne τ_2 (Hollenberg and Evans, 1988) und eine weitere Transaktivierungsfunktion AF-2 (Aminosäureposition 727 bis 763) auch an der Transaktivierung beteiligt.

Im Gegensatz zur Aktivierungsfunktion AF-1 ist die AF-2 von der Ligandenbindung abhängig (Danielian et al., 1992). Außerdem enthält sie die Oberfläche für die Interaktion mit Hitzeschockproteinen sowie ein zweites Signal zur Translokation in den Kern.

Die Ligandenbindedomäne sorgt für die Formung der Ligandenbindetasche, die aus 12 amphipatischen α -Helices und einem β -Faltblatt aufgebaut ist. Nach Ligandenbindung schließen die Helices 10, 11 und 12 durch intramolekulare Umlagerungen die Bindetasche und es entstehen neue interaktive Proteinoberflächen. Die Struktur der Ligandenbindetasche zeigt große Ähnlichkeit innerhalb der Familie der nukleären Rezeptoren (Bourguet et al., 1995; Darimont et al., 1998).

1.3 Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor

Der aktivierte hormonegebundene GR wirkt im Zellkern nun auf verschiedene Weise. Er ist in der Lage als Homodimer an spezifische DNA-Sequenzen zu binden und die Transkription spezieller Zielgene zu aktivieren (Transaktivierung). Andererseits kann der GR auch die transkriptionelle Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren, wie z. B. AP-1, reprimieren (Transrepression).

1.3.1 Die Transaktivierungsfunktion des GR

Der GR ist in der Lage die Transkription spezifischer Gene zu aktivieren. Zu diesem Zweck bindet der hormonbeladene GR als Homodimer direkt an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen seiner Zielgene (Beato et al., 1995; Yamamoto, 1985). Diese DNA-Erkennungssequenz wird als GRE (engl.: *glucocorticoid responsive element*) bezeichnet und kann nur durch dimerisierten GR gebunden werden. Es handelt sich dabei um eine palindromische Sequenz (Konsensus: AGAACANNNTGTTCT). Beispiele für positiv hormonabhängig regulierte Gene durch den GR sind das Gen für die Tyrosin-Aminotransferase (TAT) (Granner and Hargrove, 1983), die an der Glukoneogenese beteiligt ist, der LTR (*Long Terminal Repeat*)-Promotor des MMTV (*Maus Mamma Tumor Virus*) (Ponta et al., 1985) sowie das menschliche Metallothionein IIA-Gen (Karin et al., 1984).

Zur optimalen Transaktivierung von Genen werden beide Aktivator-Domänen des GR benötigt, die AF-1 und AF-2. Die AF-1 am N-Terminus arbeitet hormonunabhängig, während die AF-2 am C-Terminus zur Aktivierung die Hormonbindung benötigt. Es ist noch nicht vollständig bekannt, wie Bindung des dimerisierten GR an GREs zur Transaktivierung führt. Der basale Transkriptionskomplex, bestehend aus RNA-Polymerase II und allgemeinen Transkriptionsfaktoren wie TBP (*TATA box-binding protein*) muss am Promotor rekrutiert sein. Nach Bindung an die DNA kann der GR direkt mit basalen Transkriptionsfaktoren interagieren, wie z.B. TFIIB, TBP und TAFII30 (Horwitz et al., 1996). Diese sind aber nur zum Teil zur Transaktivierungsfunktion des GR nötig.

Wichtiger für die transaktivierende Funktion des GR ist die Interaktion mit Koaktivatoren, welche die Rekrutierung des basalen Transkriptionskomplexes ermöglichen oder die Chromatin-Struktur beeinflussen (Collingwood et al., 1999; Glass and Rosenfeld, 2000; Jenkins et al., 2001; McKenna et al., 1999).

Koaktivatoren sind definitionsgemäß Faktoren, die nicht an der basalen Transkription beteiligt sind. Sie können keine Transkription induzieren, da sie keine DNA-Bindedomäne besitzen, mit der sie an Promotoren binden könnten. Es existieren zwei generelle Klassen von Koaktivatoren:

- Mitglieder der SWI/SNF-Proteinfamilie
- Mitglieder der Histon-Azetyltransferase-Familie

Die Koaktivatoren CBP und p300 besitzen Histon-Azetyltransferase-Aktivität (HAT), die es ihnen ermöglicht Histone zu acetylieren. Dadurch wird die Chromatinstruktur aufgelockert und Transkriptionsfaktoren können leichter an Promotorregionen binden. Dies verstärkt die Transkription (Berger, 1999; Chakravarti et al., 1996; Hanstein et al., 1996; Kamei et al., 1996). CBP/p300 interagieren direkt mit der AF-1 und indirekt mit der AF-2 des GR. Die Interaktion von CBP/p300 mit der AF-2 wird vermittelt durch einen anderen Koaktivator mit HAT-Aktivität, SRC-1/NCoA-1 (Onate et al., 1995; Yao et al., 1996). Dieses Protein gehört zur p160-Familie an Koaktivatoren, zu denen auch GRIP/TIF2/NcoA-2 gehört. Diese binden hauptsächlich an die AF-2. Diese Bindung wird durch ein gemeinsames Motiv bestimmt, das LXXLL-Motiv in sogenannten NR-Boxen der Koaktivator-Proteine.

CBP/p300 binden direkt mit der RNA-Helikase A, die wiederum an die RNA-Polymerase II bindet. Dadurch und mit zusätzlicher HAT-Aktivität wird die Chromatinstruktur gelockert und die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes erleichtert (Nakajima et al., 1997).

BRG-1 ist eine Komponente des humanen SWI/SNF-Komplexes und bindet an den GR. Dies führt zu einer Entfernung des Histons H1 vom Chromatin und erlaubt sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren oder Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie einen erleichterten Zutritt zur Promotorregion (Fryer and Archer, 1998). Dadurch bildet sich der Prä-Initiationskomplex leichter und die Transkription wird unterstützt (Orphanides et al., 1996; Wilson et al., 1996; Zawel and Reinberg, 1993).

1.3.2 Die Transrepressions-Funktion des GR

Es ist bis heute nicht gelungen ein allgemein gültiges Modell für die Transrepression durch den GR zu erstellen. Das Problem liegt zum Teil darin, dass der GR ganz unterschiedliche Gene mit völlig verschiedenen Promotorsequenzen reprimiert. Auffallend dabei ist nur, dass ein Großteil der Gene an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt ist, die z. B. für Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und Enzyme kodieren, welche an entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Diese Gene haben die Gemeinsamkeit, dass sie u. a. durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B positiv reguliert werden.

Dies lässt darauf schließen, dass die anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekte der Glukokortikoide auf die Transrepressionsfunktion des GR zurückzuführen sind und auf der Hemmung der Aktivität von NF- κ B und AP-1 durch den GR basieren. Es existieren verschiedene Modelle, wie der GR die Genexpression reprimiert.

1.3.2.1 Repression durch Hemmung der Signaltransduktion

Der GR reprimiert den Transkriptionsfaktor AP-1. Eine Möglichkeit, wie dieser Mechanismus abläuft, besteht in der Inhibierung der Jun-Kinaseaktivität (JNK) durch den GR (Caelles et al., 1997). AP-1 (Aktivatorprotein 1) ist eine dimere Transkriptionsfaktoren-Familie und spielt eine

entscheidende Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Tumorbildung (Angel and Karin, 1991). Die AP-1-Transkriptionsfaktoren-Familie beinhaltet zahlreiche Proteine, die als Dimere assoziiert sind. Diese bestehen aus Mitgliedern der Jun-Familie (cJun, JunB und JunD), der Fos-Familie (cFos, FosB, Fra1 und Fra2) sowie der CREB/ATF-Familie. Ein gemeinsames Motiv der AP-1-Familie ist der Leuzin-Reißverschluss, der zur Dimerisierung benötigt wird, sowie die basische Region, welche DNA-Bindung vermittelt. Der Leuzin-Reißverschluss ist verantwortlich für die Dimer-Bildung mit anderen Proteinen, die ein solches Motiv aufweisen. Dimerisierung ist zur DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 unbedingt erforderlich (Papavassiliou et al., 1995). Jun/Fos-Dimere binden mit höherer Affinität an heptamere TRE-(TPA responsive element) (De Cesare et al., 1995) DNA-Bindestellen, während Jun/ATF-Dimere eher an oktameren CRE-(*cAMP responsive element*) Bindestellen lokalisiert sind (Hai et al., 1989). AP-1 wird durch Stimuli wie Mitogene, Onkoproteine, Zytokine und UV-Strahlung aktiviert. Die Aktivierung von cJun wird durch die aminoterminal Phosphorylierung an den Serinresten 63 und 73 gesteigert (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991). Diese Phosphorylierung wird durch die Mitglieder der Jun-Kinase-Familie (JNK, *cjun amino-terminal kinase*) vermittelt (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993) und ist notwendig zur Rekrutierung des Koaktivators CBP (Arias et al., 1994; Bannister et al., 1995).

Der hormon-aktivierte GR ist in der Lage die Aktivierung der JNK zu hemmen und verhindert dadurch die Aktivierung von cJun (Caelles et al., 1997). Dazu müssen jedoch sehr hohe Konzentrationen an Hormon eingesetzt werden (10^{-6}); die Repression von AP-1 kann jedoch schon bei einer Konzentration von 10^{-10} beobachtet werden (Jonat et al., 1990). Damit dürfte die Hemmung der JNK-Aktivität nicht der allgemeine Mechanismus der AP-1-Repression durch den GR sein.

1.3.2.2 Repression durch Synthese eines Inhibitors

Die Synthese eines inhibitorischen Proteins ist eine mögliche Erklärung für die Repression von NF- κ B durch den GR. Die NF- κ B-Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus verschiedenen

DNA-bindenden Proteinen, die alle eine N-terminale RelA-Homologiedomäne enthalten. Diese Domäne dient der DNA-Bindung, der Dimerisierung, der nukleären Lokalisation und zur Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. mit I κ B-Proteinen (Dumont et al., 1998). NF- κ B-Dimere liegen inaktiv u. a. an I κ B-Proteine gebunden im Zytosol vor. I κ B maskiert die nukleären Lokalisations-Sequenzen von NF- κ B und verhindert so dessen Translokation in den Kern (Dumont et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert, z. B. durch Zytokine, TNF α , LPS, UV-Bestrahlung, Oxidantien (Ghosh et al., 1998; Karin and Ben Neriah, 2000; Karin et al., 2002), was in einem ersten Schritt dazu führt, dass I κ B-Proteine phosphoryliert, ubiquitiniert und am Proteasom abgebaut werden. Das freigesetzte NF- κ B-Dimer transloziert in den Kern und aktiviert Gene unterschiedlichster Wirkung. NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in verschiedensten Prozessen, z. B. in Entzündungsreaktionen, Entwicklung des Immunsystems, Apoptose, Lernverhalten des Gehirns und Knochenentwicklung. Die Antwort auf entzündungsfördernde Stimuli vermitteln vier Mitglieder der NF- κ B-Familie: p50, p52, RelA/p65 und cRel. Sie bilden untereinander Homo- sowie Hetero-Dimere, um an DNA zu binden und aktivieren immunologisch relevante Zielgene, wie z.B. Oberflächenrezeptoren, Zytokine etc. Diese Zielgene können durch Glukokortikoide reprimiert werden, der Mechanismus ist aber noch unklar.

Glukokortikoide aktivieren die Synthese von I κ B-Proteinen (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995a). Die Induktion von I κ B stellt aber nicht den generellen Mechanismus der NF- κ B-Repression dar, da z.B. eine transkriptionell inaktive Dimerisierungs-defekte GR-Mutante keine Induktion von I κ B zeigte, aber dennoch in der Lage war NF- κ B effizient zu reprimieren (Heck et al., 1997). Außerdem kann in vielen Zelltypen die NF- κ B-Repression als eindeutig von der I κ B-Induktion unabhängig angesehen werden (Brostjan et al., 1996; De Bosscher et al., 1997; Wissink et al., 1997).

1.3.2.3 Repression über GR-Bindestellen in den Promotoren der Zielgene

Repression über nGRE-Elemente: Die Regulation erfolgt durch Konkurrenz um überlappende Bindestellen. Diese Bindestellen unterscheiden sich von klassischen GREs dadurch, dass nach Bindung des GR keine Aktivierung der Transkription erfolgt. Daher werden sie als negative GREs bezeichnet. Diese Bindestellen zeigen keine Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz eines klassischen GREs. GR-Bindung an nGREs vermittelt z. B. den negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen adrenalen Glukokortikoiden und Adrenokortikotropin der Hypophyse (POMC, CRH), Knochen- sowie Hautfunktionen (Osteocalcin, Keratin) und Entzündungen (IL-1 β) (Dostert and Heinzl, 2004). Z.B. im Fall des Osteocalcin-Promotors überlappt die GR-Bindestelle mit der Bindestelle von TBP, und damit reprimiert der GR, da er die Bindung eines basalen Transkriptionsfaktors verhindert (Stromstedt et al., 1991).

Regulation über zusammengesetzte Elemente (*composite elements*): Hier interagiert der GR mit anderen Transkriptionsfaktoren, die an benachbarte Bindestellen assoziiert sind. Zahlreiche Beispiele für eine solche Regulierung zwischen GR und AP-1 existieren, zum Beispiel bei der Regulation des Proliferin. Hier bindet der GR an den Promotor, kann aber nur in Anwesenheit von AP-1 die Transkription regulieren. Besteht AP-1 aus einem Heterodimer aus cJun und cFos, wird die Transkription des Proliferin-Gens reprimiert. Bei der Bindung eines cJun-Homodimers erfolgt Aktivierung der Transkription (Diamond et al., 1990; Zhang et al., 1991).

1.3.2.4 Repression durch Interaktion des GR mit dem positiv regulierenden Transkriptionsfaktor ohne GR-DNA-Bindung

Die meisten der immunregulatorischen Gene, die durch Glukokortikoide reprimiert werden, unterstehen der positiven Kontrolle der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B, enthalten aber keine GR-Bindestellen in ihren Promotoren. Daher wird die Repression dieser Gene wahrscheinlich durch Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GR und dem positiv regulierenden Transkriptionsfaktor vermittelt.

Ein Beispiel hierfür ist die Repression von AP-1 auf die Transkription des menschlichen KollagenaseI-Gens durch den GR (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Das KollagenaseI-Gen besitzt eine Bindestelle für AP-1, aber keine weitere Bindestelle für den GR in seinen Promotoren. KollagenaseI ist eine Metalloprotease und maßgeblich an der Gewebeerstörung infolge rheumatoider Arthritis beteiligt. Die Expression unterliegt der Kontrolle von AP-1, das an sogenannte „TPA-reagierende Elemente“ (TRE) in der Promotorregion des Gens bindet (Angel et al., 1987; Lee et al., 1998).

Es wurde gezeigt, dass für die Repression die direkte Bindung von GR an die DNA nicht notwendig ist und AP-1 an die DNA gebunden bleibt. Das heißt, der GR hemmt die positive Regulation von AP-1 ohne direkt an die DNA zu binden oder AP-1 von seiner Bindestelle zu verdrängen (Jonat et al., 1990). Die Repression ist zudem wechselseitig. In Genen, die vom GR positiv reguliert werden, kann AP-1 als Repressor wirken und den an das GRE gebundenen GR hemmen (Schüle et al., 1990). Mit Hilfe von GR-Mutanten, die ihre Fähigkeit zur Dimerisierung verloren haben, konnte gezeigt werden, dass zur Repression der monomere GR ausreicht (Heck et al., 1997). Obwohl der GR nicht an DNA bindet, sind die DBD des Rezeptors sowie Bereiche des N-Terminus notwendig zur AP-1-Repression (Kerppola et al., 1993; Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). All dies lässt darauf schließen, dass die Repression von AP-1 durch Protein-Interaktionen des GR vermittelt wird. Die einfachste vorstellbare Möglichkeit wäre, dass der GR direkt mit AP-1 interagiert. Dafür sprechen *in vitro* Interaktionsstudien. *In vivo* konnte dies bislang nicht nachgewiesen werden.

Neben AP-1 wird auch für die NF- κ B-Repression ein Mechanismus diskutiert, der eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem GR und der RelA/p65-Untereinheit von NF- κ B beinhaltet (McKay and Cidlowski, 1999). Die Interaktion wird durch die DBD des GR und der Rel-Homologiedomäne von RelA/p65 vermittelt (Caldenhoven et al., 1995; McKay and Cidlowski, 1998; Ray and Prefontaine, 1994; Scheinman et al., 1995b). Die Repression ist wechselseitig, denn NF- κ B kann die Aktivität des GR hemmen. Auch hier wird NF- κ B nicht vom Promotor verdrängt (Brostjan et al., 1996; Ray and Prefontaine, 1994; Scheinman et al.,

1995b; Van de et al., 1994). Der genaue Mechanismus der NF- κ B-Repression durch GR infolge von Protein-Protein-Wechselwirkung ist noch nicht bekannt.

Der Repressionsmechanismus des GR ist immer noch ungeklärt. Ein Modell zur Erklärung der AP-1-Repression durch den GR liegt in der Konkurrenz um gemeinsame Koaktivatoren durch diese beiden Transkriptionsfaktoren (Kamei et al., 1996). Aufgrund dieser Theorie soll der gemeinsame Koaktivator CBP/p300, der limitierend in Zellen vorliegt, von GR gebunden werden und damit zur Koaktivierung von AP-1 nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies führt zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität von AP-1.

Dieses Modell wurde auch für die Repression von NF- κ B durch den GR diskutiert (Lee et al., 1998; Sheppard et al., 1998b; Zong et al., 1998). Allerdings werden NF- κ B-Zielgene unabhängig von der Menge des Koaktivators CBP reprimiert (De Bosscher et al., 2000a). Durch die Überexpression der RelA/p65-Untereinheit wird die Repression auch nicht verstärkt, sondern aufgehoben (Caldenhoven et al., 1995), obwohl CBP ein Koaktivator für NF- κ B ist. Wäre CBP tatsächlich der limitierende Faktor, so sollte jede Aktivierung des GR zur Hemmung aller Transkriptionsfaktoren führen, deren Koaktivator CBP ist. Dies ist aber nicht der Fall, die Repression beschränkt sich größtenteils auf AP-1 und NF- κ B.

1.4 AP-1-Repression durch den GR bedarf zusätzlicher Faktoren

Bislang ist ungeklärt, wie die Interaktion von AP-1 mit dem GR, sofern eine direkte Interaktion überhaupt *in vivo* stattfindet, zu einem inaktiven Komplex führen kann. Es wäre möglich, dass zur Repression weitere Proteine notwendig sind. Diese könnten entweder eine Brückenfunktion zwischen GR und AP-1 einnehmen oder gemeinsam mit AP-1 und GR im Komplex dazu führen, dass die transkriptionelle Aktivität reprimiert wird. Folgende Befunde sprechen für die Hypothese, dass weitere Proteine erforderlich sind:

1.4.1 Zellspezifität

Die AP-1-Repression ist zellspezifisch, d. h. es könnten zusätzliche zellspezifische Faktoren benötigt werden (Shemshedini et al., 1991).

1.4.2 Rekonstituierbarkeit in Hefe

Die Repression von AP-1 durch den GR kann in Hefezellen nicht rekonstituiert werden, obwohl sowohl AP-1 (als Heterodimer aus cJun und cFos) als auch der GR funktionell exprimiert werden können (Schneider 2000, unveröffentlichte Daten).

1.4.3 Kristallisation

Trotz zahlreicher Bemühungen war eine Ko-Kristallisation von GR mit AP-1 bzw. NF- κ B nicht möglich (Xu, unveröffentlichte Daten).

1.5 Suche nach zusätzlichen Faktoren, die möglicherweise bei der Repression von AP-1 durch den GR benötigt werden

Mit Hilfe des *Two-Hybrid*-Systems in der Hefe wurde nach potentiellen Interaktionspartnern der GR-Mutante GRmH12 Δ AF-1 gesucht (Schneider, 2000). Diese Mutante trägt eine Punktmutation in der Helix 12 der Ligandenbindedomäne sowie eine Deletion der N-terminalen Transaktivierungsfunktion AF-1. Aufgrund dieser Veränderungen ist diese Mutante transkriptionell inaktiv, zur Transrepression aber noch befähigt. Mit dieser Mutante interagierende Proteine wurden in einem zweiten Schritt ebenfalls im *Two-Hybrid*-System der Hefe mit der Mutante GRmDBD auf Interaktion getestet (Schneider, 2000). Diese Mutante besitzt zwei Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne (C476E und R479Q). Sie ist weder zur Transaktivierung noch zur Transrepression befähigt, kann allerdings *in vitro* noch an AP-1 binden. Das bedeutet, Proteine, die mit der Mutante GRmH12 Δ AF-1 interagieren und nicht mit der Mutante GRmDBD, könnten an der Repression beteiligt sein.

Eine sehr starke und hormonabhängige Interaktion mit GRmH12ΔAF-1, nicht jedoch mit GRmDBD zeigte das Protein Trip6 (Kassel et al., 2004). Trip6 könnte somit ein zusätzlicher Faktor sein, der bei der Repression von AP-1 durch den GR benötigt wird.

1.6 Trip6

Trip6 wurde 1995 als Thyroidhormon-Rezeptor-interagierendes Protein identifiziert (Lee et al., 1998). Außerdem zeigt es hormonabhängige Interaktion mit einem weiteren nukleären Rezeptor, dem Retinsäurerezeptor. Beide reprimieren AP-1. Es handelt sich bei Trip6 also um einen sehr potenten Kandidaten für die AP-1-Repression durch den GR. Das Protein besteht aus 476 Aminosäuren und besitzt am C-Terminus drei Lim-Domänen.

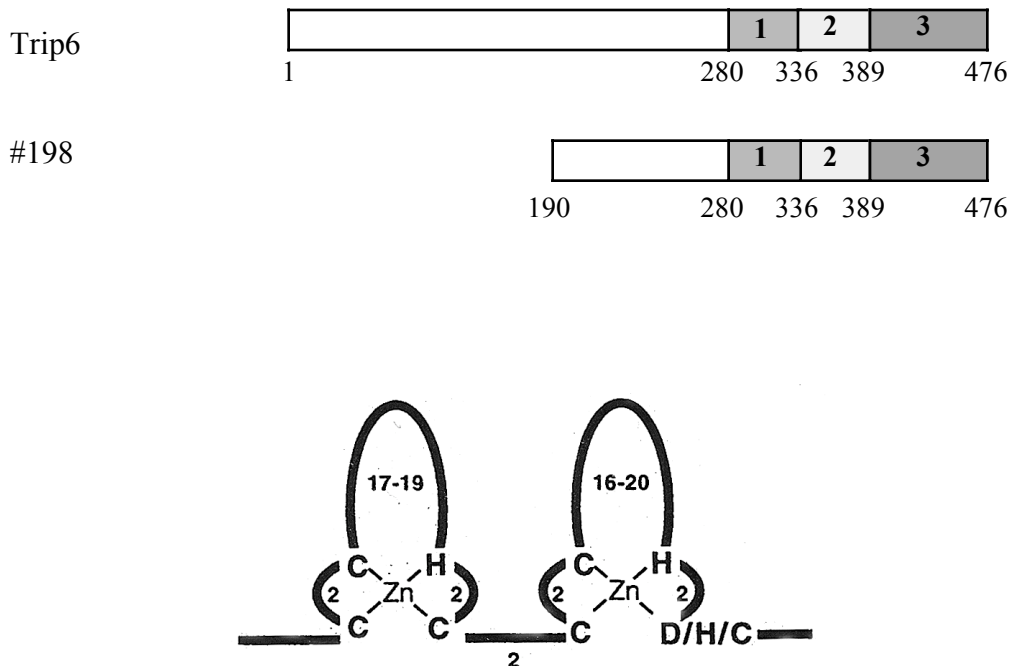


Abb.2: Trip6

Das komplette Protein Trip6 besteht aus 476 Aminosäuren und besitzt eine prolinreiche Region (AS 1-280) sowie drei C-terminale Lim-Domänen (AS 280-476). #198 bezeichnet das längste *Two-Hybrid*-Isolat von Trip6 und umfasst die Aminosäuren 190-476. Daher wird dieses Protein auch Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ genannt; das untere Bild zeigt das doppelte Zinkfingermotiv einer Lim-Domäne.

Die Lim-Domäne wurde zuerst in den drei Homöodomänen-Proteinen Lin11, Isl-1 und Mec-3 entdeckt, daher entstand der Name „Lim“. Eine Lim-Domäne ist eine Cystein-Histidin-reiche Region, die durch Zink koordiniert wird. Sie besteht aus zwei benachbarten Zinkfingern (Dawid et al., 1998; Jurata and Gill, 1998).

Nach Sequenz-Homologien wurden drei verschiedene Klassen von Lim-Domänen eingeteilt. Zu den Klasse I-Lim-Domänen-Proteinen gehören die LHX-Proteine, die LMOs und Lim-Kinasen. Ihre Lim-Domänen sind in Tandemanordnung anzutreffen. Diese Klasse an Lim-Domänen ist hauptsächlich im Zellkern zu finden. Die LHX-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die DNA durch ihre Homöodomäne binden und in der Embryonalentwicklung entscheidend regulieren. LMO-Proteine bestehen nur aus Lim-Domänen („Lim-only proteins“) und sind als transkriptionelle Kofaktoren bekannt. Lim-Kinasen passen nicht exakt in dieses Schema, da sie sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma auftreten.

Klasse II-Lim-Domänen zeigen eine hohe Sequenz-Homologie. Sie bestehen hauptsächlich aus Lim-Domänen. Die Klasse III ist sehr heterogen. Zu ihr gehören Proteine mit unterschiedlicher Anzahl an Lim-Domänen, die jeweils am C-Terminus lokalisiert sind. Klasse II- und Klasse III-Lim-Domänen-Proteine befinden sich zum großen Teil im Zytoplasma, wie die Zyxin- oder Paxillin-Familie (Dawid et al., 1998). Die Mitglieder der Zyxin-Familie, zu denen neben Trip6 auch LPP, Ajuba und Zyxin zählen, sind an Fokalkontakten assoziiert. Dies sind Multiproteinkomplexe, die in der Zelle an Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontaktstellen assoziiert sind. Diese Komplexe regulieren Signaltransduktion, indem sie Proteine aktivieren (Turner, 2000) oder als Binde-Plattform für Proteine des Signalwegs zur Verfügung stehen (Matsuya et al., 1998).

Trip6 kolokalisiert mit F-Aktin entlang von Aktinfilamenten, wahrscheinlich zur Regulation der Dynamik des Zytoskeletts (Cuppen et al., 2000). Aufgrund eines nukleären Exportsignals (NES) ist Trip6 im Zytoplasma vorzufinden. Für andere Proteine dieser Familie, z.B. Zyxin, ist beschrieben, dass sie zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln (Nix and Beckerle, 1997). Daher nimmt man an, dass diese Lim-Domänen-Proteine als sogenannte Biosensoren wirken und durch Wandern zwischen den Zellkompartimenten die Kommunikation zwischen Zytoplasma

und Zellkern vermitteln (Kadmas and Beckerle, 2004; Wang and Gilmore, 2003b). Es stellt sich die Frage, wie ein fokales Adhäsionsmolekül wie Trip6 in die Transrepression von AP-1 bzw. NF- κ B involviert sein kann. Für andere Proteine der Klasse III-Lim-Domänen wurde das bereits beschrieben. Hic5/ARA55 ist wie Trip6 ein Klasse III-Lim-Domänen-Protein und als Adaptor-Molekül involviert in Fokalkontakte. Hic5/ARA55 ist ein Koaktivator für Steroidrezeptoren, z. B. GR und AR (Kasai et al., 2003; Yang et al., 2000).

1.7 Zielsetzung

In unserem Labor wurde Trip6 mit Hilfe eines *Two-Hybrid*-Systems als noch unbekannter Interaktionspartner des GR identifiziert. Es war mein Ziel in dieser Arbeit die mögliche Beteiligung von Trip6 im Transrepressions-Prozess zu untersuchen.

Dazu wurden folgende Teilziele angestrebt:

- 1) Trip6 wird als zytoplasmatisches Protein beschrieben. Um Einfluss auf den GR-vermittelten Transrepressionsprozess auszuüben, sollte das Protein zumindest zu dieser Funktion im Kern lokalisiert sein. Daher muss die subzelluläre Lokalisation von Trip6 genau untersucht werden.
- 2) Aus dem *Two-Hybrid*-Experiment geht hervor, dass Trip6 an den GR binden kann. Für eine Funktion im Crosstalk sollte Trip6 zusätzlich auch mit AP-1 und NF- κ B interagieren. Zusätzlich soll die Anwesenheit von Trip6 im Transkriptionskomplex *in vivo* untersucht werden.
- 3) Welche Funktionen erfüllt Trip6 während der Transkription?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

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

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Nordwald, Hamburg
Bacto Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Bradford-Lösung	Biorad, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA Rinderserum Albumin	PAA, Cölbe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	Biosynth AG, Staad (Schweiz)
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
Donor Kälberserum (DCS)	Invitrogen, Eggenstein
Dexamethason	Sigma, München
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Invitrogen, Eggenstein
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Standards für Gelelektrophorese (100Bp+1000Bp)	PeqLab, Erlangen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticin-Sulfat (G418)	Invitrogen, Eggenstein
Glutathion	Roth, Karlsruhe

Glutathion Sepharose TM 4 Fast Flow	Amersham, Freiburg
Glycylglycin	Sigma, München
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Sigma, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hybond-N+Membran	Amersham, Freiburg
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, Eschbronn
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Biosynth AG, Staad (Schweiz)
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichts-Standard für SDS Elektrophorese	PeqLab, Erlangen; Sigma, München
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Nick TM Column	Amersham, Freiburg
N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
N,N'-Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka, München
Opti-MEM I	Invitrogen, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (PIC)	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenglycol 4000	Roth, Karlsruhe
Propanol	Roth, Karlsruhe
Protein A-Sepharose	Amersham, Freiburg
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Puromycin	Sigma, München
RNAse A	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma, München
TNF α (rekombinater humaner Tumor Nekrose Faktor α)	PromoCell, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Eggenstein
Tween20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck Biosciences GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Sigma-Aldrich GmbH (München) und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

2.1.2 Kits

Easy Pure Kit	Biozym, Hess. Oldendorf
ECL™ Western blotting detection reagents	Amersham, Freiburg
FUGENE	Roche Diagnostics, Mannheim
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Eggenstein
PeqGOLD TriFast Lösung	peqLab, Erlangen
TNT Transkription/Translations System	Promega, Mannheim
ZeroBlunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen, Eggenstein
Passive Lysis Buffer, 5x	Promega, Mannheim
Redi Prime Random Primer Labeling	Amersham, Freiburg
Quick-Hyb Hybridisierungslösung	Stratagene, Heidelberg
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Düsseldorf

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Eppendorf Reaktionsgefäße (1, 5 + 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Blaukappen-Röhrchen (15+50ml)	Greiner, Nürtingen
Hyperfilm XR [®] (ECL und MP)	Amersham, Freiburg
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon)	Millipore, Schwalbach
Whatman-3MM-Papier	VWR, Bruchsal
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen (Quick Seal)	Beckmann, Stuttgart

2.1.4 Geräte

Bakterienschüttler	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
CO ₂ - Inkubatorschrank	Heraeus, Fellbach
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
	BRL, Eggenstein
	Hofer Scientific Instruments (USA)
ELISA-Lesegerät	Biotek Instruments (USA)
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven (USA)

Geltrockner	BioRad, München
Image Reader FLA-3000	Fujifilm, Nakanuma (Japan)
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckmann, Stuttgart
Luminometer	Berthold, Wildbad
Mikrowelle	Hoover, Hongkong (China)
Netzgeräte für Elektrophorese	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer	VWR, Bruchsal
PCR-Geräte	Perkin Elmer, (USA)
Perkin Elmer Cetus 9600 Thermocycler	Perkin Elmer, (USA)
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	Glatt AG (Schweiz)
Szintillationszähler	Kontron Analytical, (Schweiz)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator (IL-350M)	Bachhofer, Reutlingen
Ultraschall-Desintegrator (Branson B15 Sonifier)	Branson Sonic Power Co. (USA)
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Vakuum-Konzentrator (" <i>speed vac</i> ")	Savant, Farmingdale
Vortex-Schüttler	Bender & Hohbein, Karlsruhe
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Promega (Mannheim), Invitrogen (Eggenstein) oder United States Biochemicals (Cleveland, USA) bezogen.

2.1.6 Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Freiburg) und seit 2004 von der Firma PerkinElmer (Boston, USA) bezogen.

2.1.7 Bakterienstämme

E.coli BL21 (DE3)pLysS: Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen

Genotyp: E. coli B; F⁻; ompT; hsdS_B; (r_B⁻, m_B⁻); dcm; galλ; (DE3); pLysS (Cam^r)

E.coli DH5α: Bakterienstamm für Klonierungen

Genotyp: F⁻; Φ80d lacZ M15; endA1, recA1, hsdR17 (rk-“mk-); supE44#

2.1.8 Kulturmedien für Bakterien

Für die Aufzucht von E.coli-Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Guthrie and Fink, 1991; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1988). Die Medien wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert.

Agarplatten wurden aus den Medien durch Zugabe von 2 % Bacto-Agar (Difco) hergestellt. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf w/v.

2.1.9 Medien für E.coli Kulturen

Vollmedium (Luria Broth, LB) pH 7,5: 1% Hefe-Extrakt
1% Bacto-Trypton
0,5% NaCl

Dem Vollmedium wurden bei Bedarf 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

SOC-Medium pH 7,4: 2% Bacto-Trypton
0,5% Hefe-Extrakt
0,4% D-Glukose
10 mM NaCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
2,5 mM KCl

2.1.10 Zelllinien und Transfektionsreagenzien

- Cos7:** Affen-Nierenzelllinie; Glukokortikoidrezeptor defizient; Cos7-Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert.
- HeLa tk⁻:** Menschliche Zervixkarzinom-Zelllinie; Subklon der parentalen HeLa-Linie ohne Thymidinkinaseaktivität. HeLa-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.
- FTO:** Ratten-Leberzellen; FTO-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.
- HEK293:** Humane embryonale Nierenzellen;
- A549:** Humane Lungenkarzinom-Zelllinie;
- Cos7-Zellen wurden mit Hilfe von FUGENE6 (Roche), HeLa- und FTO-Zellen mit Lipofektamin (Invitrogen) transfiziert.

2.1.11 Plasmide

2.1.11.1 Expressionsplasmide

- RSV-GR:** Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, GSF, Neuherberg; enthält die cDNA des humanen GR im Expressionsvektor RSV.
- RSV-GR_{mH12ΔAF-1}:** Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, GSF, Neuherberg; enthält die cDNA des humanen GR mit einer Punktmutation in der Helix12 (E755Q) und einer zusätzlichen kompletten Deletion der AF-1 im Expressionsvektor RSV.
- pRShR⁺:** Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, GSF, Neuherberg; Kontrollvektor ohne Glukokortikoidrezeptor cDNA-Sequenz (Cato und Ponta, 1989).
- pcDNA3.1-HA:** Enthält das Hämagglutinin Epitop aus *Hämophilus influenzae* mit vorangehender Kozak-Sequenz als HindIII/EcoRI-Fragment aus pCHB (zur Verfügung gestellt von C. Englert, IMB, Jena) in pcDNA3.1+;
- Kozaksequenz: AAGCTTCCGGCC
- Leserahmen: AGC CTG GGA ATT CTG CAG ATA TCC

- pcDNA3.1Trip6:** Enthält die cDNA des humanen Trip6; diese cDNA wurde aus HeLa-cDNA unter Verwendung der Trip6_{forw}-und Trip6_{rev}-Primer amplifiziert und als EcoRI/XhoI- Fragment in pcDNA3.1+ kloniert.
- pcDNA3.1T6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶:** Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid-Isolats (#198) als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ aus pGAD GH-#198.
- pcDNA3.1-HAT6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶:** Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid-Isolats (#198) als EcoRI (blunt)/XhoI-Fragment aus pGAD GH-#198 in pcDNA3.1-HA (ebenfalls EcoRI(blunt)/XhoI).
- pcDNA3.1-HATrip6:** Enthält die cDNA des humanen Trip6 als EcoRI(blunt)/XhoI-Fragment aus pcDNA3.1-Trip6 in pcDNA3.1-HA (ebenfalls EcoRI(blunt)/XhoI).
- pcDNA3.1-HA-GR:** Enthält die cDNA des humanen GR als BamHI (blunt)/XbaI aus pMThGR (zur Verfügung gestellt von M.Göttlicher, GSF, Neuherberg) in pcDNA3.1-HA (geschnitten EcoRI (blunt)/XbaI). Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden.
- pcDNA3.1-Gal4_{DBD}:** Enthält die Gal4_{DBD} als HindIII/BamHI-Fragment aus pAS1-CYH2 in pcDNA3.1+; Leserahmen:
GCC ATG GAG GCC CCG GGG ATC CAC TAG TCC AGT GTG
- pcDNA3.1-GalTrip6:** Enthält die Trip6 cDNA fusioniert an Gal4_{DBD}; die Gal4_{DBD} wurde aus pAS1-CYH2 (Clontech) als HindIII/BamHI(blunt)-Fragment in pcDNA3.1-Trip6 (geschnitten mit HindIII/EcoRI (blunt)) kloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).
- pcDNA3.1-GalT6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶:** Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid-Isolats (#198) fusioniert an Gal4_{DBD}; die Gal4_{DBD} wurde aus pAS1-CYH2 als HindIII/BamHI(blunt)-Fragment in pcDNA3.1-#198 (geschnitten mit HindIII/EcoRI (blunt)) kloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

pcDNA3.1-GalTrip6Lim1: Enthält die Trip6-cDNA der Lim-Domäne 1, fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 1 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim1_{forw} und Lim1_{rev} amplifiziert und als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als EcoRI/XbaI-Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umkloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

pcDNA3.1-GalTrip6Lim2: Enthält die Trip6-cDNA der Lim-Domäne 2, fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 2 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim2_{forw} und Lim2_{rev} amplifiziert und als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als EcoRI/XbaI-Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umkloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

pcDNA3.1-GalTrip6Lim3: Enthält die Trip6-cDNA der Lim-Domäne 3, fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 3 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim3_{forw} und Lim3_{rev} amplifiziert und als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als EcoRI/XbaI-Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umkloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

pcDNA3.1-GalTrip6Lim1+2: Enthält die Trip6-cDNA der Lim-Domänen 1 und 2, fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domänen 1+2 wurden mit Hilfe von PCR vom Template pcDNA3.1-#198 und den Primern Lim1_{forw} und Lim2_{rev} amplifiziert und als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ kloniert und als EcoRI/XbaI-Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umkloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

- pcDNA3.1-GalTrip6Lim2+3:** Enthält die Trip6-cDNA der Lim-Domänen 2 und 3, fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domänen 2 und 3 wurden vom Template pcDNA3.1-#198 mit Primer Lim2_{forw} und Lim3_{rev} amplifiziert und als EcoRI/XhoI-Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als EcoRI/XbaI-Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umkloniert (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).
- pcDNA3.1-HAT6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m:** Enthält die cDNA des längsten *Two-Hybrid*-Isolats (#198) als EcoRI (blunt)/XhoI-Fragment aus pGAD GH-#198 in pcDNA3.1-HA. Anschließend wurden die koordinierenden Cysteine beider Zinkfinger der 1.Lim-Domäne durch Alanin ersetzt mit dem *Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).
- pcDNA3.1-HATrip6Lim2m:** Enthält die cDNA des humanen Trip6 als EcoRI(blunt)/XhoI-Fragment aus pcDNA3.1-Trip6 in pcDNA3.1-HA. Anschließend wurden die koordinierenden Cysteine beider Zinkfinger der 2. Lim-Domäne durch Alanin ersetzt. Dies geschah mit Hilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).
- pcDNA3.1-HATrip6Lim3m:** Enthält die cDNA des humanen Trip6 als EcoRI(blunt)/XhoI-Fragment aus pcDNA3.1-Trip6 in pcDNA3.1-HA. Anschließend wurden die Zinkfingerkoordinierenden Cysteine beider Zinkfinger der 3. Lim-Domäne durch Alanin ersetzt. Dies geschah mit Hilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (zur Verfügung gestellt von S. Schneider, Ganymed, Mainz).

2.1.11.2 Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen

- pGEX-4T-1,2, 3:** Ausgangsvektoren für die Expression von GST-Fusionsproteinen (Promega, Mannheim) in allen drei Leserahmen; in Bakterien exprimiert liefern sie die Glutathion-S-Transferase.
- PGEX-T6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶:** Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid-Isolats (#198), fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-3 kloniert.
- pGEX-Lim1:** Enthält die cDNA der Lim-Domäne 1 aus dem Vektor pcDNA3.1-Gal-Trip6 Lim1 von Trip6, fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-1 kloniert.
- pGEX-Lim2:** Enthält die cDNA der Lim-Domäne 2 aus dem Vektor pcDNA3.1-Gal-Trip6 Lim2 von Trip6, fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-1 kloniert.
- pGEX-Lim3:** Enthält die cDNA der Lim-Domäne 3 aus dem Vektor pcDNA3.1-Gal-Trip6 Lim3 von Trip6, fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-1 kloniert.
- pGEX-Lim1+2:** Enthält die cDNA der Lim-Domänen 1+2 aus dem Vektor pcDNA3.1-Gal-Trip6 Lim1+2 von Trip6, fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-1 kloniert.
- pGEX-Lim2+3:** Enthält die cDNA der Lim-Domänen 2+3 aus dem Vektor pcDNA3.1-Gal-Trip6 Lim2+3 von Trip6, fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-1 kloniert.
- pGEX-T6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m:** Enthält die cDNA des längsten *Two-Hybrid*-Isolats (#198), fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-3 kloniert. Anschließend wurde das SbfI/XhoI-Fragment von pcDNA3.1-HA-198-Lim1m eingesetzt und somit das SbfI/XhoI-Fragment dieses Konstruktes ersetzt.

pGEX-T6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim2m: Enthält die cDNA des längsten *Two-Hybrid*-Isolats (#198), fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-3 kloniert. Anschließend wurde das SbfI/XhoI-Fragment von pcDNA3.1-HA-Trip6-Lim2m eingesetzt und somit das SbfI/XhoI-Fragment dieses Konstruktes ersetzt.

pGEX-T6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m: Enthält die cDNA des längsten *Two-Hybrid*-Isolats (#198), fusioniert an GST; die cDNA wurde als EcoRI/XhoI-Fragment in pGEX-4T-3 kloniert. Anschließend wurde das SbfI/XhoI-Fragment von pcDNA3.1-HA-198-Lim3m eingesetzt und somit das SbfI/XhoI-Fragment dieses Konstruktes ersetzt.

2.1.11.3 Plasmide zur *in vitro* Translation

pGEMcFos3: Enthält die komplette cDNA von cFos im pGEM-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die SP6-Polymerase verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).

pcDNA3.1-HA-GR: Enthält die cDNA des humanen GR als BamHI (blunt)/XbaI aus pMThGR (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, GSF, Neuherberg) in pcDNA3.1-HA (geschnitten EcoRI (blunt)/XbaI). Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden.

pBSK-relA(#454): Enthält die komplette cDNA von RelA /p65 im Blueskript SK(+)-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von F. Weih, IMB, Jena).

pcDNA-RelB (#504): Enthält die komplette cDNA von RelB im pcDNAI-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von F. Weih, IMB, Jena).

pcDNA-cRel: Enthält die komplette cDNA von cRel im pcDNA3.1+-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von M. Diefenbacher; FZK, Karlsruhe).

- pcDNA-p50 (#506):** Enthält die komplette cDNA von p50 im pcDNAI-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von F. Weih, IMB, Jena).
- pcDNA-p52 (#509):** Enthält die komplette cDNA von p52 im pcDNAI-Vektor; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von F. Weih, IMB, Jena).
- pBAT-cJun:** Enthält die cDNA von humanem cJun Position +180/+1625; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von P. Angel, DKFZ, Heidelberg).
- pcDNA-JunB:** Enthält die cDNA von JunB im Vektor pcDNA3.1; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T7 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von P. Angel, DKFZ, Heidelberg).
- pBAT-JunD:** Enthält die cDNA von JunB; zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von P. Angel, DKFZ, Heidelberg).
- pBAT-ATF2:** Enthält die cDNA von ATF2 im pBAT-Vektor. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von H. van Dam, Leiden, Niederlande).
- pBAT-GR Δ 9-385:** Enthält die cDNA von humanem GR ohne Aminosäureposition 9-385. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).
- pBAT-GR Δ 385-428:** Enthält die cDNA von humanem GR ohne Aminosäureposition 385-428. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).
- pBAT-GR Δ 428-490:** Enthält die cDNA von humanem GR ohne Aminosäureposition 428-490. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).

pBAT-GR Δ 491-515: Enthält die cDNA von humanem GR ohne Aminosäureposition 491-515. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).

pBAT-GR Δ 491-777: Enthält die cDNA von humanem GR ohne Aminosäureposition 9-385. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK, Karlsruhe).

CS2-Fra1: Enthält die cDNA von Fra1 aus der Ratte, Fragmentgröße 1,2kb nach Verdau mit EcoRI-XbaI. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase SP6 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von P. Angel, DKFZ, Heidelberg).

CS2-Fra2: Enthält die cDNA von Fra2, Fragmentgröße 2,3 kb nach Verdau mit BamHI-XhoI. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase SP6 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von P. Angel, DKFZ, Heidelberg).

pEP-FosB: Enthält die cDNA von FosB. Zur *in vitro* Translation muss die RNA-Polymerase SP6 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von H. van Dam, Leiden, Niederlande).

2.1.11.4 Reporter

-517/+63Coll-Luc: Enthält den Bereich -517 bis +63 des menschlichen KollagenaseI-Promotors, kloniert in die Luziferase-Kassette des Plasmids pXP₂ (Schneikert et al., 1996).

Ubi-Renilla: Enthält die cDNA der Renilla-Luziferase, kloniert hinter den UbiquitinC-Promotor (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, GSF, Neuherberg).

MMTV-Luc: Enthält das HindIII/BgII MMTV-LTR-Fragment, kloniert in die Luziferase-Kassette des Plasmids pXP₂ (pHCwt-Luc; (Heck et al., 1997)).

Gal-Luc: Pentamer einer GAL-4-Bindeseite, fusioniert an die Sequenz +1/+38 des Adenovirus-E4-Promotors und eines Luziferase-Gens (pG5.EfdeltaLux3; (Weg-Remers et al., 2001)).

2.1.11.5 Proben für die *Northern-Hybridisierung*

GAPDH(Ratte): pGAPDH-13 (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Fort et al., 1985) wurde mit PstI verdaut, das 1,3 kb-Fragment isoliert und markiert.

Interleukin8 (Il-8): Verwendet wurde das 1,605 kb große Fragment des RZPD-Klons IRAKp961P2321 nach Verdau mit EcoRI/XhoI.

KollagenaseI: Verwendet wurde das 2 kb große Fragment humaner cDNA der KollagenaseI nach HindIII/SalI Verdau (Jonat et al. 1990).

2.1.12 Oligonukleotide

2.1.12.1 Zur Verwendung in der Chromatin IP

Coll-I Promotorregion (-219/-41):	5'-GCAGAGTGTGTCTCTTTTCGCACAC-3' 5'-GCCCTTCCAGAAAGCCAGAGGCTG-3'
Coll-I kodierende Region (+837/+1024):	5'-GATGTGGCTCAGTTTGTCCT -3' 5'-CTTGGCAAATCTGGCGTGTA -3'
Il-8 Promotorregion (-121/+61):	5'-GGGCCATCAGTTGCAAATC -3' 5'-TTCCTTCCGGTGGTTTCTTC -3'
Il-8 kodierende Region (+879/+1095):	5'-GCCTTCCATAGTCTCCAAAT-3' 5'-TGGTCCACTCTCAATCACTC-3'
U6snRNA (-245/+85):	5'-GGCCTATTTCCCATGATTCC-3' 5'-ATTTGCGTGTTCATCCTTGC-3'

2.1.12.2 Zur Verwendung in siRNA

Die verwendeten synthetischen siRNA-Oligomere umfassen die Trip6-Sequenz von Position 1263 bis Position 1283. Die Kontroll-si-Oligomere betreffen das Luziferase-Gen. Beide Oligomere wurden von MWG Biotech bezogen.

2.1.13 Antikörper

Anti-Trip6:	Polyklonales Kaninchenserum gegen den kodierenden Bereich des längsten <i>Two-Hybrid</i> -Isolats (#198) von Trip6; hergestellt von Genosys Biotechnologies (Pampisford, UK); Verdünnung im Westernblot 1:500-1:1000; Einsatz in Chromatin-IP: 2µg/ml
Anti-Maus HRP:	Peroxidase-konjugiertes Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer P 0447; Verdünnung im Westernblot 1:2000
Anti-Kaninchen HRP:	Peroxidase-konjugiertes Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer P 0448; Verdünnung im Westernblot 1:2000
Anti-GR:	Polyklonales anti-Kaninchen-IgG-Immunglobulin gegen den C-Terminus des Glukokortikoid Rezeptors (GR) Santa Cruz; sc-1002 Einsatz in Chromatin-IP: 2µg/ml
Anti-NCL-GCR	Monoklonales anti-Maus-IgG2a-Immunglobulin gegen den N-Terminus des Glukokortikoid Rezeptors (GR) Novocastra Verdünnung im Westernblot: 1:250
Anti-cFos	Polyklonales anti-Kaninchen-IgG-Immunglobulin gegen cFos Upstate; # 06-341 Verdünnung im Westernblot: 1:1000
Anti-cFos	Polyklonales anti-Kaninchen-IgG-Immunglobulin gegen cFos Santa Cruz; sc-52 Einsatz in Chromatin-IP: 2µg/ml
Anti-IgG	Kaninchen-IgG, nicht immunisiert Upstate; #12-370 Einsatz in Chromatin-IP: 2µg/ml
Anti-p65	Polyklonales anti-Kaninchen-IgG-Immunglobulin gegen den C-Terminus von p65 Santa Cruz; sc-372 Einsatz in Chromatin-IP: 2µg/ml Einsatz im Westernblot: 1:500
Anti-GST	Monoklonale anti-Maus-IgG2b-Aszitesflüssigkeit gegen Glutathion-S-Transferase (GST) Sigma, #G-1160 Einsatz im Westernblot (Spot-Technologie): 1:1000

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Transfektionsmethoden

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 6% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C; 1,4 bar; 20 min). Alle verwendeten Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM) mit 10% FCS bzw. DCS kultiviert.

FCS: Fötales Kälberserum für Cos7- Zellen
DCS: Donor Kälberserum für HeLa- sowie FTO-Zellen

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

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

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

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

Das Auftauen der Zellen erfolgte für ca. 20 Sekunden bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden sie in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300g, 3 min) und auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

Einfriermedium: FCS + 10% DMSO

2.2.1.4 Induzieren von Zellen

Die Zellen wurden immer mit 10^{-7} M Dexamethason, 50ng/ml TPA bzw. 10ng/ml TNF α induziert.

2.2.1.5 Transiente Transfektionen von Cos7-Zellen mit FUGENE zur Messung der Reporter-Gen-Aktivität

Pro Ansatz wurden jeweils 6×10^4 frisch passagierte Cos7-Zellen in die Vertiefung einer 12-Loch-Zellkulturplatte transferiert. Anschließend erfolgte die Transfektion im Verhältnis 3(Fugene):1(DNA). 100 ng des DNA-Anteils bestehen aus Reporter-Gen (Luziferase) bzw. der Reporter-Kontrolle (Renilla-Luziferase). Die Lösung aus Fugene und DNA wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Nach 12 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, dabei wurden die Zellen bei 0% FCS gehungert. 12 Stunden später wurden die Zellen bei Bedarf mit TPA, TNF α oder Dexamethason induziert. Das Ernten der Zellen erfolgte nach 12-16 Stunden mit anschließender Messung der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität.

2.2.1.6 Transiente Transfektionen von HeLa-Zellen mit Lipofektamin zur Messung der Reporter-Gen-Aktivität

Pro Ansatz wurden jeweils 4×10^5 HeLa-tk⁻-Zellen in die Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte transferiert. Dies erfolgte 12 Stunden vor Transfektion. Das Transfektionsverhältnis betrug 2 μ l Lipofektamin : 0,63 μ g DNA. Das heißt, es wurden 2 μ g DNA (davon wie unter 2.2.1.4 beschrieben jeweils 100ng Reporter) sowie 6,4 μ l Lipofektamin in jeweils 100 μ l serumfreiem Medium zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden beide Ansätze vereinigt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit konnten die HeLa-Zellen mit neuem Medium versorgt werden. Anschließend wurden sie vorsichtig mit dem DNA-Lipofektamin-Mix beträufelt. Die Transfektion erfolgte über Nacht; am folgenden Morgen wurde das Medium

gewechselt, die Zellen abends bei Bedarf mit TPA, TNF α oder Dexamethason induziert und am folgenden Morgen zur Messung der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität geerntet.

2.2.1.7 Transiente Transfektionen zum Ausschalten (*silencing*) von Zielgenen in HeLa-Zellen mit Hilfe von si-Oligomeren

Die transiente Transfektion zum Ausschalten spezifischer Gene erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers von Lipofektamin 2000. Es wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte jeweils 4×10^5 -HeLa- tk^- Zellen am Vorabend der Transfektion ausgesät. Dazu wurde Opti-MEM-I-Medium ohne Serum verwendet. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 100 pmol spezifische si-Oligomere bzw. Kontroll-si-Oligomere in 250 μ l Opti-MEM I pipettiert. Parallel dazu wurden 250 μ l Opti-MEM I mit 5 μ l Lipofektamin 2000 versetzt. Nach 5minütiger Inkubationszeit wurden beide Ansätze vereinigt. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturplatte vorsichtig geschwenkt. Zur Analyse im Westernblot wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer geerntet. Zur Analyse im Northernblot wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion entweder 5 Stunden mit TPA behandelt oder 3 Stunden mit TNF α , je nach Bedarf in Anwesenheit von Dexamethason.

Transiente Transfektionen zum Ausschalten von Zielgenen wurden auch für die Chromatin-IP benutzt. In diesem Fall wurde das Verhältnis an Reagenzien auf die Fläche einer 15 cm-Kulturschale hochgerechnet. Das Verfahren wurde in gleicher Weise durchgeführt und die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion zur Chromatin-IP verwendet.

2.2.1.8 Reporter-Gen-Aktivität – Messung der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferaseaktivität

Die Messung der exprimierten *Photinus pyralis*-Luziferase (*Firefly*) sowie der Aktivität des Genprodukts des *Renilla*-Plasmids erfolgte aus demselben Zellextrakt (Matthews et al., 1977 CW).

Die Zellen wurden 24-48 h nach der Transfektion zweimal mit PBS (ohne Ca/Mg) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200-400 µl Lysispuffer (*5 x passive lysis buffer*, Promega) für 5-10 min bei 4°C lysiert. 100 µl wurden zur Bestimmung der Firefly-Aktivität verwendet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in einem Luminometer unter Zugabe von autoinjizierter Luziferin-Reaktionslösung (100 µl pro Ansatz, Endkonzentration Luziferin 40 µM) und Reaktionslösung (350 µl pro Ansatz).

Luziferin-Stocklösung:	1 mM Luziferin (0,28 mg/ml) in GlyGly-Puffer
Luziferin-Reaktionslösung:	1:5 Verdünnung der Stocklösung in GlyGly
GlyGly-Puffer:	25 mM GlyGly; 15 mM MgSO ₄ ; 4 mM EGTA; pH 7,8
Reaktionspuffer:	1 mM DTT; 2 mM ATP in GlyGly

Zur Bestimmung der Renilla-Luziferaseaktivität wurden 10 µl des Lysats mit 390 µl Coelenterazinpuffer und 100 µl 5x Substratlösung versetzt (Endkonzentration 25 nM Coelenterazin). Nach Mischen wurde die Lumineszenz in einem Luminometer (Berthold, Wildbad) gemessen (ohne Injektion der Reaktionslösungen).

Coelenterazinpuffer:	0,1 mM KPi; 0,5 M NaCl; 1mM EDTA; pH 7,6
5x Coelenterazinsubstratlösung:	1 µl Stammlösung in 8 ml Coelenterazinpuffer (125 nM)
Coelenterazin-Stammlösung:	1 mM Coelenterazin in 90% Methanol, 10% HCl konz.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

2.2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

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

2.2.2.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte mindestens 1 Stunde bei -20°C. Das Präzipitat wurde bei 13000 g 20 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2% Agarose-Gele mit einem Gelvolumen von 50–250 ml, Puffervolumen von 100–500 ml und Taschenvolumen von 20 µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 1x TAE gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1–5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1x TAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben wurden aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

1x TAE: 40 mM Tris pH 8,3; 40 mM NaAcetat; 2 mM EDTA pH 8,0
Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

2.2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde am UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des *Easy-Pure-Kits* (Biozym, Hess. Oldendorf) nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro 100 µg Gelstück wurden 300 µl „Salt“-Lösung und 10 µl „Bind“ verwendet. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit 20 µl Wasser eluiert und direkt für Ligationen oder andere Anwendungen eingesetzt.

2.2.2.6 Plasmid-DNA-Mini-Präparation nach der LiCl-Methode

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin bzw. Kanamycin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 40 s bei 13 000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl TELT + 20 µl Lysozym resuspendiert und für 3 min bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Abkühlung für 5 Minuten auf Eis. Nach 8 minütiger Zentrifugation bei 13 000 UpM wurde das Pellet mit einer 1000µl Pipettenspitze abgezogen und der Überstand mit 100µl Isopropanol versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 UpM. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA für ca. 20 Minuten luftgetrocknet und in 50 µl Wasser bei 37°C für 20 Minuten gelöst.

TELT: 50mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5mM EDTA; 2,5M LiCl; 0,4% Triton X-100
Lysozym: 10mg/ml in TE

2.2.2.7 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3600 g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien wurden danach in 10 ml P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysate wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (20 min auf Eis),

bei 4°C und 10000g 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip-AX-500-Säulen laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

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

2.2.2.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h.

2.2.2.9 Dephosphorylierung von DNA

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

Bei 3'-überhängenden und glatten Enden wurde 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert (ebenfalls mit Zugabe von 1 µl Enzym nach den ersten 15 min).

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

CIP-Puffer: 50 mM Tris pH 9,0; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin
1x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

2.2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 μ l 10x Ligasepuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (2 U/ μ l) versetzt und in einem Endvolumen von 20 μ l für 16 h bei 16°C inkubiert. Für die Ligation inkompatibler Enden wurde ein dreifacher Überschuss an freien Enden des Inserts eingesetzt, für die Ligation von glatten Enden (*blunt*) wurden gleiche Mengen von Vektor und Insert verwendet.

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

2.2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (E. coli)

Der Bakterienstamm E. coli XL1blue, BL21 oder DH5a wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 100 ml Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (meist 800 ml) im Verhältnis 1/100 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A6.9, 5000 UpM, 10 min, 4°C) wurden diese mit jeweils 10 ml pro 50 ml Ausgangskultur eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und anschließend ebenfalls in 10 ml pro 50 ml Ausgangskultur kalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 1 h auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert und in 1/30 bis 1/50 des Originalvolumens in 50 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und in 200 μ l aliquoten Teilen abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 100 μ l Zellsuspension verwendet.

CaCl₂-Lösung: aus 2,5 M Stocklösung verdünnt auf 50 mM, bei Bedarf Zugabe einer 50% Glycerinlösung bis zur Endkonzentration 15%

2.2.2.12 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl kompetente Bakterien wurden mit Plasmid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen vermischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s und Inkubation für 5 min auf Eis wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Kultur für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf einer Agarplatte ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

2.2.2.13 Klonierung mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Pfu-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cycler: 1/10 Volumen 10x Pfu-PCR-Puffer mit MgSO₄, je 20 µM dNTP-Lösung, je 1 µM Primer, 1-2 U Pfu-DNA-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die DNA wurde bei 95°C für 1 min denaturiert und bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur hybridisiert. Die DNA-Synthese erfolgte bei 72-74°C, wobei die Faustregel gilt, dass die Pfu-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann. Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

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

2.2.2.14 Sub-Klonierung in TOPO-Vektor

Die PCR-Produkte wurden zur weiteren Klonierung im ersten Schritt mit Hilfe des *ZeroBlunt^RTOPO^RPCR Cloning Kit* subkloniert. Es wurde nach Protokoll des Herstellers gearbeitet. 0,5-4 µl des frischen PCR-Produktes wurden direkt mit 1 µl Salzlösung und 1 µl pCRII-Blunt-TOPO-Vektor versetzt und nach vorsichtigem Mischen 5 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µl der Probe zu den chemisch kompetenten Bakterien pipettiert. Die Lösung wurde für 5-30 Minuten auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec wurden die Bakterien mit 250µl SOC versetzt und 5 Minuten auf Eis gehalten. Nach einstündigem Schütteln bei 37°C konnten die Bakterien auf Selektions-Agarplatten ausplattiert werden.

2.2.2.15 DNA-Sequenzierung mit ³²P markierten Didesoxy-NTPs:

Gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode mit Hilfe des "Thermo-Sequenase-Kit" der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) sequenziert. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 2 µl Reaktionspuffer, je 2 pmol Primer und 8 U Thermo Sequenase™ DNA-Polymerase und Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Jeweils 4,5 µl wurden in vier markierte PCR-Gefäße (ACGT) pipettiert und der Terminationsmix (je 0,5 µl einer Stocklösung von 0,3 µM[α-³³P]ddNTP, 1500 Ci/mmol und 2 µl 7,5 µM dNTP) den entsprechenden Ansätzen zugegeben. Die Proben wurden in einem Perkin-Elmer-Cycler unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

95°C, 30 s;

55°C, 30 s;

72°C, 1 min, 30-60 Zyklen.

Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer und 3minütigem Erhitzen auf 95°C wurden die Proben auf einem denaturierenden 6%igem Polyacrylamid/8,3 M Harnstoff-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Formamid-Probenpuffer: 20 mM EDTA pH 7,8; 95% Formamid; 0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau

2.2.2.16 Kommerzielle Sequenzierungen bei der Firma GATC

Größere Sequenzierungen (>100 Basen) wurden kommerziell bei der Firma GATC in Auftrag gegeben.

2.2.3 RNA

2.2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Adhärenz wachsende HeLa-Zellen wurden in 10 cm-Schalen kultiviert, über Nacht gehungert und anschließend mit TPA (50 ng/ml; 5 Stunden), TNF α (10 ng/ml; 3 Stunden) oder Dexamethason (10 nM; 15 Minuten) behandelt. Zur Kontrolle wurde eine nicht behandelte Probe mitgeführt. Die Zellen wurden mit 1 ml *peqGOLD TriFast Lysisbuffer* pro 10 cm² Kulturschale für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert - diese Zeit gewährleistet die Dissoziation der Nukleotidkomplexe -, mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform pro ml Lysisbuffer wurde 30 s gründlich mit dem Vortexer gemischt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die beiden Phasen durch eine 15minütige Zentrifugation bei 12000 UpM getrennt. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt, mit 500 μ l Lysisbuffer vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Das RNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 UpM und 4°C pelletiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in deionisiertem Wasser gelöst. Nach Messung der RNA-Konzentration wurde die RNA-Lösung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der RNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. 1 g Agarose wurde dazu in 100 ml MOPS-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Das flüssige Gel wurde mit 3,5 ml 37%iger Formaldehyd-Lösung sowie 2 μ l Ethidiumbromid versehen, in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen und nach Polymerisation mit MOPS-Puffer überschichtet. Die RNA wurde für 15 Minuten bei 65°C denaturiert, mit Probenpuffer versetzt und im Gel über 4 Stunden bei 70V aufgetrennt. Unter langwelligem UV-Licht wurde die ribosomale RNA sichtbar gemacht und fotografiert. Auf diese Weise können Unterschiede bezüglich der eingesetzten RNA-Menge festgestellt werden.

MOPS: 20mM 4-Morpholinpropansulfonsäure; 5mM Natriumazetat; 1mM Na₂EDTA pH7,0
RNA-Probenpuffer: MOPS; 22,6% Formaldehyd; 64,5% Formamid

2.2.3.3 Northernblot

Die nach Größe aufgetrennte RNA wurde aus dem Gel mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (*Hybond N+nylon membrane*) transferiert. Dafür wurde das Gel auf drei Lagen mit 20xSSC Puffer gesättigtem Whatman-3MM-Papier platziert, wobei beide Enden der Papierlage in 20xSSC Puffer eintauchten. Auf das Gel kam eine seiner Fläche entsprechend große Nylonmembran, drei Lagen mit 20xSSC Puffer gesättigte Filterpapiere und ein Stapel Zellstoffhandtücher. Der ganze Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Nach etwa 16 Stunden war die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde dann im *UV- Stratalinkers 2400* (Einstellung: 254nm, „*autocrosslink*“) bestrahlt, anschließend in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

10xSSC-Puffer: 1,5M NaCl; 0,15M Natriumcitrat pH 7,0

2.2.3.4 Radioaktive Markierung

Zur radioaktiven Markierung von cDNA-Fragmenten wurde der *Rediprime Kit* eingesetzt. Die dort angewandte Methode (nach Feinberg und Vogelstein, 1983) beruht auf einer Anlagerung von Hexanukleotidprimern aller statistisch möglichen Nukleotid-Sequenzen an die Einzelstränge der zu markierenden DNA. Dabei wird der komplementäre Strang, ausgehend von den 3'-Enden der „*random*“ (Zufalls-) Oligonukleotide, mit Hilfe der DANN-Polymerase I (dem Klenow-Enzym) synthetisiert. Auf diese Weise werden die als Substrat angebotenen ³²P-markierten Deoxynukleosidtriphosphate in den entstehenden komplementären Strang eingebaut. Gemäß Protokoll wurden 60-100 ng Plasmid-DNA in 45 µl TE-Puffer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in ein Rediprime-Reaktionsröhrchen gegeben, welches ein Lyophilisat aus den random-Hexanukleotiden, DNA Polymerase I, dNTPs und Reaktionspuffer enthält. Anschließend wurden 5 µl ($\alpha^{32}\text{P}$)-dCTP (300Ci/mM, 10mCi/ml) zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reinigung des markierten DNA-Fragments erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex-G50-DNA-Säule (*NICK Column*): die markierte cDNA wurde mit 400 µl TE-Puffer eluiert, während sich die nicht inkorporierten Radionukleotide

an der Säulenmatrix gebunden haben. Zur Bestimmung des radioaktiven Einbaus in die Polynukleotidkette wurde 1 µl des Eluats im Szintillationsmessgerät gemessen.

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0
10xSSC: 1,5M NaCl; 0,15M Natriumcitrat pH7,0

2.2.3.5 Northernblot-Hybridisierung

Für die Hybridisierung der markierten Sonde mit der immobilisierten DNA auf der Nylonmembran wurde die Hybridisierungslösung *Quick Hyb* verwendet. Den Anweisungen des Herstellers entsprechend wurde die Membran für 20 Minuten bei 68°C in 10ml Hybridisierungslösung unter ständigem Rotieren vorhybridisiert. Anschließend wurde der Lösung die zuvor in Gegenwart von 1mg Heringssperma-DNA denaturierte (5 min; 95°C), radioaktiv markierte cDNA-Sonde (12×10^6 cpm) zugegeben und eine Stunde unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss an den Hybridisierungsvorgang wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer I gespült, dann mit Waschpuffer I für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zum Schluss einmal mit Waschpuffer II für 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad gewaschen. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt.

Waschpuffer I: 2xSSC; 0,1%SDS
Waschpuffer II: 0,1xSSC; 0,1%SDS

2.2.3.6 Detektion von radioaktiven Signalen

Der in Plastikfolie eingeschweißten Membran wurde ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt und dieser danach entwickelt.

2.2.4 Protein-Methoden

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. Die Extinktion bei 660 nm wurde im ELISA-Reader (Titertek Multiskan PLUS) gemessen; die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Regressionsgeraden der mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration (1-5µg) erstellten Eichkurve berechnet.

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

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation und Entfernung des Isopropanols wurde die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Ausformung von Geltaschen eingesetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs wurden mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 20 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel wurde entweder nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau getrocknet oder die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen (Westernblot).

Trenngel-Lösung:	6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Sammelgel-Lösung:	4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS
2x Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2% 2-Mercaptoethanol

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

Die Sichtbarmachung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte durch *Coomassie-Brilliant-Blau*-Färbung. Dazu wurde das Gel 30 min in Färbelösung (0,5 ml/cm² Gelfläche) und danach in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Vakuum bei 80°C für eine Stunde getrocknet.

Färbelösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure
Entfärbelösung 1: 50% Methanol; 10% Essigsäure

2.2.4.4 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Westernblot“)

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer sogenannten „halbtrockenen“ (*Semi-Dry*) Transferzelle auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen 5 Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatman-3MM-Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei konstant 20 Volt. Danach wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 40 Minuten in 5% fettfreier Milch in TBST geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in TBST gewaschen und danach 40 Minuten mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm² Membranfläche) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert und anschließend entwickelt.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol
TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH7,6
TBST: TBS + 0,05% Tween 20

2.2.4.5 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten

Für die Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten wurden $5 \times 10^6 - 10^7$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt, in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesammelt und abzentrifugiert (800g, 2 min). Die Hälfte der Zellen wurde in 100-200 µl Lysispuffer aufgenommen, sonifiziert und als Gesamtzellextrakt verwendet. Die andere Hälfte der Zellen wurde für 3 Minuten in 100-200 µl Lysispuffer auf Eis lysiert und für 5 Minuten bei 800g zentrifugiert. Der zytosolische Extrakt (Überstand) wurde für 20 Minuten bei 15000 g aufgereinigt. Die pelletierten Kerne wurden in Lysispuffer ohne NP40 gewaschen und anschließend in 100-200 µl Lysispuffer resuspendiert und sonifiziert. Die so erhaltenen Extrakte wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Lysispuffer: 25 mM HEPES-KOH pH7,9; 50 mM NaCl; 1,5 mM EDTA; 0,5% NP-40; 1 mM PMSF; PIC

2.2.5 Analyse von Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionen

2.2.5.1 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen

2.2.5.1.1 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Eukaryontische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden. Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Roh-Lysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde dazu in eines der drei pGEX-3T-Plasmide (das Leseraster der Insertionsstelle ist jeweils um ein Nukleotid verschoben - damit stehen alle drei Leseraster zur Verfügung) an das 3'-Ende des GST-Gens fusioniert.

Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurde die Expression des

Fusionsproteins mit 1mM IPTG induziert und die Bakterien wurden nach weiteren 2-4 h durch Zentrifugation (3000g, 10 min, 4°C) sedimentiert, in eiskaltem Puffer E (5% des Kulturvolumens) resuspendiert und durch Sonifikation lysiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10000g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS äquilibrierter Glutathion-Agarose (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein) für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Lag die Glutathion-Agarose bereits in 20 % Ethanol vor, so wurde von dieser 1:1 Lösung 1 ml verwendet und vor Gebrauch zweimal mit PBS gewaschen. Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 5 mM reduziertes Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in Fraktionen aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (geeigneter Konzentration) mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen eiskaltes PBS über Nacht dialysiert. So gereinigtes Fusionsprotein wurde zu einer Konzentration von 10% mit Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 l mit H₂O
PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄
Puffer E: 50 mM HEPES pH 7,9; 15 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 mM DTT

2.2.5.1.2 *In vitro* Translation

Um radioaktiv markierte Proteine für GST-Fusionsprotein-Interaktionstests zu erhalten, wurde die entsprechende cDNA *in vitro* transkribiert und die entstandene mRNA in Anwesenheit von L-[³⁵S]-Methionin *in vitro* translatiert. Diese Reaktionen wurden in einem Schritt mit Hilfe des *TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit folgenden Komponenten für 90-120 min bei 30°C:

- 25 µl TNT Retikulozytenlysat aus Kaninchen
- 2 µl TNT Reaktionspuffer
- 1 µl TNT RNA Polymerase (T3, SP6 oder T7)
- 1 µl Aminosäuren-Lösung (ohne Methionin, 1 mM)
- 4 µl L-[³⁵S]-Methionin
- 1 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µg kodierendes Plasmid
- ad 50 µl H₂O

Die *in vitro* translatierten Glukokortikoidrezeptor-Proteine bzw. -Mutanten wurden im Anschluss an die TNT-Reaktion durch Inkubation mit Dexamethason (10⁻⁷ M) für 15 min bei RT und 15 min auf Eis in einen aktiven, mit Hormon beladenen Zustand gebracht.

2.2.5.1.3 GST-Fusionsprotein-Interaktionstest

Die Interaktion zweier Proteine wurde mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen und *in vitro* translatierten Proteinen untersucht. Hierbei macht man sich die Affinität von GST-Fusionsproteinen zu immobilisiertem Glutathion zunutze. 10 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurden an 20 µl Glutathion-Agarose (1:1 in PBS ohne Kalzium und Magnesium) in einem Mindestvolumen von 800 µl PBS (mit 1 mM DTT) für 20 min bei RT und 1 h bei 4°C unter Rotieren gebunden. Anschließend wurde die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Agarose mit 5 µl des entsprechenden *in vitro* translatierten, ³⁵S-markierten Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl PD-Puffer gemischt. Unter Rotieren für 30 Minuten bei 4°C wurde eine potentielle Interaktion der beiden Partnerproteine ermöglicht. Daraufhin wurde die Glutathion-Agarose durch wiederholtes Zentrifugieren (1 min, 6000g) dreimal mit eiskaltem PD-Puffer gewaschen. Alle Proben wurden während dieser Zeit auf Eis gehalten. Die an das Glutathion gebundenen Proteine

wurden schließlich durch Zugabe von 2xProbenpuffer sowie Mischen und Erhitzen für 5 min bei 95°C von der Glutathion-Agarose eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie bei -80°C.

PD-Puffer: 40 mM HEPES-KOH pH7,9; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,2% Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; PIC
2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2% 2-Mercaptoethanol

2.2.5.2 Nachweis von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation

Promotorbesetzungen können durch Anwendung der Chromatin-Immunopräzipitationsanalyse (ChIP) untersucht werden. Das Fixieren (*crosslinking*) von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen und die anschließende Fragmentierung des Chromatins ermöglichen eine Immunopräzipitation spezifischer Proteinkomplexe, die an bekannte Promotorsequenzen binden. Der Nachweis erfolgt nach dem Lösen der kovalenten Bindungen (*decrosslinking*) mittels PCR durch Amplifikation der Promotorregion, an welche der Protein-Komplex bindet.

2.2.5.2.1 Vorbereitung der Zellen zur Chromatin-Immunopräzipitation

Die Zellen (HeLa oder FTO) wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/15cm-Kulturschale ausgesät und nach 24 Stunden mit 0% DCS bzw. FCS gehungert. Nach 36 Stunden Hungern erfolgte die Induktion mit TPA (50 ng/ml) bzw. TNF α (10 ng/ml) für drei Stunden. Je nach Bedarf wurden die Zellen anschließend für 1 Stunde mit Dexamethason (10 nM) behandelt.

2.2.5.2.2 Formaldehyd-Fixierung von DNA-assozierten Proteinen

Zur Bindung von nukleären Proteinen an genomische DNA wurden die Zellen nach Induktion einmal mit eiskaltem PBS-Puffer sowie eiskaltem Xlink-Puffer gewaschen und dann für 20 Minuten mit 1% Formaldehyd in Xlink-Puffer bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert.

Nachdem das Formaldehyd durch einmaliges Waschen mit 0,125 M Glyzin in Xlink-Puffer entfernt worden war, erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Xlink-Puffer und abschließend einmaliges Waschen mit PBS.

Um die Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionen zu analysieren, wurden die Zellen mit 5ml PBS mittels eines Gummischabers vom Boden der Kulturschale abgelöst, in ein 50ml-Blaukappen-Reaktionsröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml RIPA-Puffer aufgenommen, resuspendiert und sonifiziert.

PBS: 137 mM NaCl; 2,7mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄

Xlink: 100mM NaCl; 50mM HEPES 7,9; 0,5mM EGTA; 1mM EDTA

RIPA: 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA; 0,5mM EGTA; 140mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% Nadeoxycholol; 0,1% SDS; 1mM PMSF; PIC

2.2.5.2.3 Sonifizieren von Chromatin

Zur Fragmentierung von Chromatin wurde das in RIPA-Puffer gelöste Zellpellet mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson B15, Heinemann; 150 Watt) sonifiziert. Dazu wurde die Probe auf Eis gehalten und insgesamt 7-mal mit 20 Ein-Sekunden-Impulsen behandelt. Die Impulsstärke betrug 30% (Stufe 1-2).

Das Sonifizieren wurde fortgesetzt, bis eine Fragmentlänge von 1kb erreicht war. Dies wurde überprüft, indem 1/200 des Lysats für 20 Minuten bei 94°C inkubiert (*decrosslinking*) und anschließend auf einem 1%-TAE-Agarosegel aufgetrennt wurden.

2.2.5.2.4 Chromatin-Immunopräzipitation

Die sonifizierte Lösung wurde mit 50 µl ProteinA-Sepharose (1:1 verdünnt in RIPA-Puffer) versetzt und für eine Stunde bei 4°C unter ständigem Rotieren prä-immunopräzipitiert (*preclearing*). Unspezifische Präzipitate wurden im *Outswing*-Rotor für 15 Minuten bei 16 000 UpM abzentrifugiert. Der chromatinhaltige Überstand wurde in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Quantifizierung des Ausgangsmaterials wurden 100 µl Lysat entnommen (*Input*) und bis zum Zeitpunkt der DNA-Reinigung bei -20°C gelagert. Die Immunopräzipitation wurde mit 2 µg spezifischem Antikörper bzw. immunologisch-inaktiven

Kontroll-Immunglobulinen (IgG) durchgeführt, indem die Proben über Nacht bei 4°C rotierten. Anschließend wurden 30 µl ProteinA-Sepharose zugegeben und für 4 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Durch kurze Zentrifugation (2 min, 6000 U/min) wurde die Sepharose sedimentiert und der Überstand aus ungebundenen, unspezifischen Chromatinfragmenten vorsichtig mit einer 27G-Injektionskanüle entfernt. Die an ProteinA-Sepharose gebundenen Antikörper-Protein-Chromatin-Komplexe wurden mit verschiedenen Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen gewaschen: zweimal mit RIPA-Puffer, einmal mit RIPA-Waschpuffer I, fünfmal mit RIPA-Waschpuffer II, einmal mit RIPA-Puffer.

RIPA-Waschpuffer I: RIPA; 100µg/ml Heringssperma-DNA
RIPA-WaschpufferII: RIPA; 100µg/ml Heringssperma-DNA; 500mM NaCl

Nach den Waschschritten konnten die Komplexe mit 100 µl Elutionspuffer nach 15minütiger Inkubation bei 37°C unter Schütteln von der ProteinA-Sepharose eluiert und nach Zentrifugation als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

Elutionspuffer: 50mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA; 100mM NaCl; 0,5% SDS

2.2.5.2.5 Lösen der Protein-DNA-Komplexe (*decrosslinking*) und Aufreinigung der DNA

Durch Zugabe von 100 µl Verdau-Puffer und 12- bis 16-stündiger Inkubation von Input und Eluat bei 55°C (3 h) bzw. 65°C (über Nacht) wurden die Proteine vollständig verdaut. Die DNA wurde danach durch eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion aufgereinigt, in Anwesenheit von Glykogen präzipitiert und in 20 µl Wasser gelöst. 2µl des Eluats wurden in einer Polymerase-Ketten-Reaktion auf Anwesenheit der entsprechenden Promotor-Zielsequenz untersucht.

Verdau-Puffer: 50mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA; 100mM NaCl; 0,5% SDS; 100µg/ml Proteinase K

2.2.5.2.6 Nachweis mittels PCR

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler des Typs Perkin Elmer 9600/2400. Alle PCR-Reaktionen zur Chromatin-IP wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, wobei 200 µM dNTPs, je 20 pmol Primer, 1,5 mM MgCl₂, 5 Einheiten *GoTaq*-DNA-Polymerase mit 1xDNA-Polymerase-Puffer vermengt wurden. 2 µl des Eluats aus der Chromatin-IP wurden als Matrize eingesetzt. Nach Denaturierung der zu amplifizierenden DNA bei 95°C für 1 Minute wurde folgender Temperatur-Zyklus zwischen 27- und 35-mal wiederholt: Denaturierung bei 95°C (1 Minute), Hybridisierung der Primer entsprechend der jeweiligen Schmelztemperatur (55-65°C) für 1 Minute, DNA-Synthese bei 72°C (1 Minute). Nach 27-35 Zyklen erfolgte eine zehninminütige Inkubation bei 72°C, gefolgt von einer dauerhaften Kühlung auf 4°C. Zur Analyse wurden die PCR-Produkte auf ein TAE-Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

2.2.5.2.7 Quantifizierung der PCR-Produkte

Für eine semi-quantitative Bestimmung der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation wurden die Proben densitometrisch unter Verwendung des *NIH-Image*-Programms analysiert. Die Daten wurden normalisiert und als Bezugspunkt wurde der jeweilige DNA-Input verwendet.

2.2.5.3 Chromatin-Doppel-IP

Mit der Chromatin-Doppel-Immunopräzipitation (ChDIP) kann bestimmt werden, ob sich verschiedene Proteine gleichzeitig an einem bestimmten Promotor aufhalten. Das Verfahren verläuft wie bei der Chromatin-IP beschrieben, mit dem Unterschied, dass nach der Immunopräzipitation mit dem spezifischen 1. Antikörper der Komplex von der Sepharose eluiert wurde. Dies geschah durch Inkubation mit 10 mM DTT für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend erfolgte eine Verdünnung von 1:500 in RIPA-Puffer und eine 2. Immunopräzipitation mit einem weiteren Antikörper. Die anschließenden Schritte verliefen wie bei der Chromatin-IP beschrieben.

2.2.5.4 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der SPOT™ -Technologie

Das Prinzip der SPOT™-Technologie basiert auf der gezielten Synthese von Peptiden auf definierten Positionen (Spots) einer Zellulosemembran. Je nach Format können zahlreiche Moleküle parallel synthetisiert werden. Dieses Verfahren wurde vollautomatisch durchgeführt unter Leitung von Claudia Ester, Arbeitsgruppe Peter Ütz, Forschungszentrum Karlsruhe. Anschließend konnten die Substanzen direkt auf der Membran auf Interaktion mit den potentiellen Partnerproteinen getestet werden.

2.2.5.4.1 Bestimmung der Interaktionsoberfläche durch 3er-Verschiebung der Aminosäuren

Mit Hilfe der SPOT-Technologie wurden Peptide vollautomatisch auf eine Cellulose-Membran gespottet, die auf Interaktion mit einem zweiten Protein getestet werden sollten. Das Peptid bestand aus den ersten 15 Aminosäuren der zu testenden Sequenz des ersten Proteins. Das nächstfolgende Peptid bestand aus den Aminosäuren 4 – 18 dieses Proteins - die Sequenz wurde also genau um drei Aminosäuren verschoben. Dies wurde solange fortgesetzt, bis die gesamte Sequenz abgedeckt war und sich zahlreiche Peptid-Spots in der Größe von jeweils 15 Aminosäuren auf der Membran befanden. Nun wurden die auf der Membran gebundenen Peptide auf Interaktion mit dem zweiten Protein getestet, indem in einem ersten Schritt die Membran 10 Minuten in Methanol aktiviert und anschließend dreimal in TBS gewaschen wurde. Es folgte ein dreistündiges Blockieren im Blockpuffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, gefolgt von einem Waschschrift mit TBS. Nun wurde die Membran mit dem GST-Fusionsprotein (10 µg/ml Blockpuffer) jenes Proteins versetzt, das auf Interaktion getestet werden sollte und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS wurde sie für drei Stunden mit einem anti-GST-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in Blockpuffer) inkubiert, anschließend mit TBST gewaschen und mit einem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000 in Blockpuffer) für 1,5 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden waren, sichtbar gemacht. Bei diesem Detektionsverfahren

wird die durch die (an die Sekundärantikörper gekoppelte) Meerrettich-Peroxidase katalysierte Oxidation des Luminols und die daraus resultierende Chemolumineszenz ausgenutzt.

Die Membran wurde 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm² Membranfläche) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert und anschließend entwickelt.

TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH7,6
TBST: TBS + 0,05% Tween 20
Blockpuffer: 2% Magermilchpulver; 5% Saccharose; TBS

2.2.5.4.2 Bestimmung einzelner interagierender Aminosäuren durch den Alanin-Scan

Zur genaueren Kartierung der interagierenden Oberfläche wurde in diesem Test ein aus 15 Aminosäuren bestehendes Polypeptid ausgewählt, welches unter Kapitel 2.2.5.4.1 sowie 2.2.5.4.2 bereits positiv auf Interaktion getestet wurde. Dieses Protein wurde in unmittelbarer Nachbarschaft eines Proteins auf die Cellulose-Membran gespottet, in dem die erste Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht worden war. Beim nächsten Peptid erfolgte ein Austausch der zweiten Aminosäure gegen Alanin. Dies wurde so lange durchgeführt, bis jede Aminosäure der Sequenz einmal gegen Alanin ersetzt wurde. Der Nachweis der Interaktion erfolgte anschließend wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben.

3 Ergebnisse

Kapitel I: Die Rolle von Trip6 bei der Repression von AP-1 und NF- κ B durch den GR

Zahlreiche Entzündungs-Reaktionen werden von den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B vermittelt. Der Glukokortikoidrezeptor (GR) ist in der Lage die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren zu reprimieren. Auf dieser molekularen Grundlage beruht zum großen Teil die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden. Der Mechanismus der Repression ist jedoch noch unklar. Bekannt ist, dass die Repression von AP-1 oder NF- κ B durch Protein-Interaktion des GR mit den reprimierten Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, da der GR nicht an DNA bindet (Heck et al., 1994), aber am Promotor lokalisiert ist. Einige Befunde deuten darauf hin, dass die Transrepression nicht auf einem direkten Kontakt zwischen AP-1 und dem GR beruht. Z.B. war es nicht möglich die beiden Transkriptionsfaktoren zusammen zu kristallisieren (Eric Xu ,unveröffentlichte Daten). Außerdem lässt sich AP-1 funktionell in Hefe rekonstituieren; Koexpression von funktionellem GR führt aber nicht zur Hemmung der AP-1-Aktivität. Diese Fakten sprechen für die Existenz zusätzlicher Faktoren, die AP-1-Repression durch den GR vermitteln.

Mit Hilfe eines *Two-Hybrid*-Systems wurde Trip6 in unserem Labor als noch unbekannter Interaktionspartner des GR identifiziert. Mein Ziel ist die mögliche Beteiligung von Trip6 im Transrepressions-Prozess zu untersuchen.

3.1 Subzelluläre Lokalisation von Trip6

Trip6 gehört zur Zyxin-Familie der Lim-Domänen-Proteine und besteht aus 476 Aminosäuren. In Analogie zu anderen Mitgliedern der Familie wird angenommen, dass es in Kontakte zwischen Zellen bzw. Zellen und der extrazellulären Matrix involviert ist (Cuppen et al., 2000; Wang and

Gilmore, 2001). Zusätzlich besitzt Trip6 ein Kern-Exportsignal in seinem Amino-Terminus (N-Terminus). Diese Tatsachen lassen eine zytoplasmatische Lokalisation von Trip6 vermuten.

Falls Trip6 in den von GR vermittelten Transrepressionsmechanismus involviert ist, muss das Protein im Kern lokalisiert sein. Für eine erste Charakterisierung wurde die subzelluläre Lokalisation von Trip6 untersucht. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte, Kern- sowie Zytoplasmaextrakte von HeLa-Zellen hergestellt und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Der Nachweis des Trip6-Proteins erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen Trip6-Antiserums. Zur Kontrolle, ob die Expression von Trip6 durch Aktivierung von AP-1, GR oder NF- κ B modifiziert werden kann, wurden HeLa-Zellen mit Dexamethason (eine Stunde) und TPA (drei Stunden) behandelt und durch Westernblot der GR und cFos sichtbar gemacht.

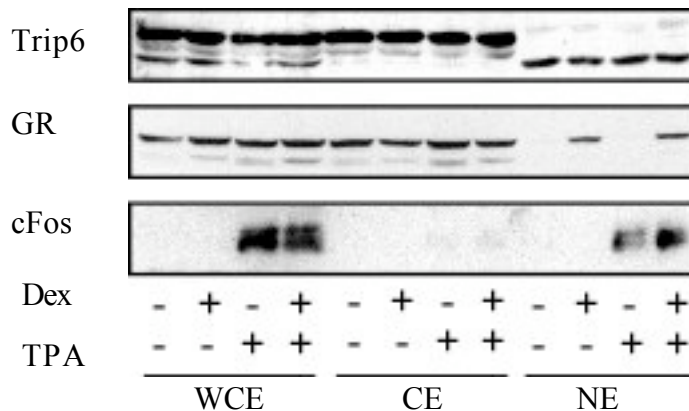


Abb.3: Subzelluläre Verteilung von Trip6

Es wurden Gesamtzellextrakte (WCE), Zytoplasma (CE)- und Kernextrakte (NE) von 1×10^6 HeLa-Zellen hergestellt. Es handelte sich dabei um uninduzierte Kontrollzellen bzw. +/-TPA- (50ng/ml für drei Stunden) und +/- Dexamethason- (Dex; 10^{-7} M für eine Stunde) behandelte Zellen. Mit 1/20 der Extrakte erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot. Trip6 wurde mit Hilfe eines polyklonalen anti-Trip6-Kaninchenserums detektiert. Anti-GR-Antikörper sowie anti-cFos-Antikörper wurden verwendet, um die Abhängigkeit der Trip6-Expression von der Aktivität der Transkriptionsfaktoren zu bestimmen.

Interessanterweise lassen sich im Gesamtzellextrakt drei verschiedene Formen von Trip6 nachweisen. Die beiden Isoformen größeren Molekulargewichtes befanden sich im Zytoplasma, während eine kleinere Isoform ausschließlich im Zellkern zu finden war. Das bedeutet, es existiert eine nukleäre Isoform von Trip6, die in kernspezifische Aufgaben wie z.B. die GR-vermittelte Transrepression involviert sein könnte. Diese kleinste Isoform, die ausschließlich im Kern lokalisiert ist, wird im Weiteren als nTrip6 (nukleäres Trip6) bezeichnet. TPA- sowie Dexamethason-Behandlung hatten keinen Einfluss auf Expression bzw. Lokalisation von Trip6.

GR transloziert nach Dexamethason-Behandlung vom Zytoplasma in den Zellkern, cFos wird nur nach Aktivierung (zum Beispiel durch den Phorbolster TPA) exprimiert und befindet sich ausschließlich im Kern. Aus diesem Grund konnte die Detektion dieser Proteine als Kontrolle für die Reinheit der präparierten zytoplasmatischen bzw. nukleären Extrakte verwendet werden. Die Präparation war erfolgreich. Es ist deutlich zu sehen, dass der GR nur nach Dexamethason-Behandlung im Zellkern vorzufinden ist. cFos kann nur nach TPA-Induktion detektiert werden und befindet sich ausschließlich im Zellkern. Nach TPA-Behandlung war im zytoplasmatischen Extrakt kein cFos detektierbar, das bedeutet, dieses Extrakt ist frei von nukleären Verunreinigungen. Andererseits konnte der GR nur nach Dexamethason-Behandlung im Kern nachgewiesen werden, demzufolge war auch das Kernextrakt frei von zytoplasmatischen Bestandteilen.

Um festzustellen, ob die subzelluläre Verteilung in mehreren Zelltypen ähnlich vorliegt, wurden Gesamtzellextrakte, Zytoplasma- sowie Kernextrakte von humanen Lungen-Karzinomzellen (A549), Nierenzellen von Meerkatzen (Cos7) sowie humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) präpariert. Auch hier erfolgte der Nachweis mit dem spezifischen anti-Trip6-Antikörper im Westernblot.

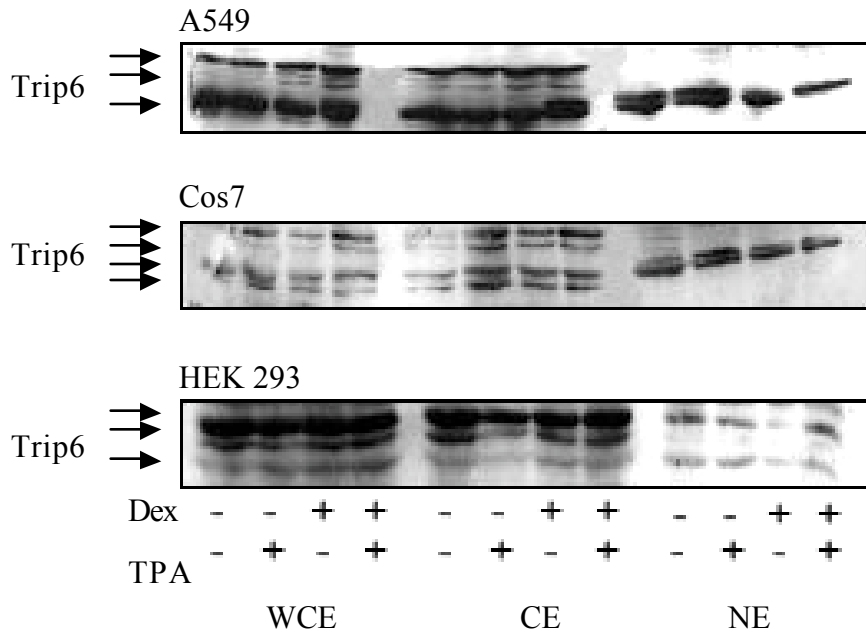


Abb.4: Unterschiedliche Zelllinien zeigen die Trip6-Isoformen

Gesamtzellextrakte (WCE), Zytoplasma (CE)- und Kernextrakte (NE) von 10⁶ Zellen verschiedener Zelllinien (A549, Cos7, HEK293) wurden einer SDS-Page unterworfen. Das Trip6-Protein wurde anschließend durch Westernblot-Analyse mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenantiserums detektiert. Es wurden unbehandelte, bzw. +/-TPA- sowie +/-Dexamethason- (Dex) induzierte Zellen verwendet. Die Pfeile kennzeichnen detektiertes Trip6.

Bei allen verwendeten Zelllinien in Abbildung 4 konnten mindestens drei Trip6-Isoformen nachgewiesen werden; die kleinste Isoform befand sich immer ausschließlich im Zellkern. Im Extrakt der Cos7-Zellen konnten vier Banden detektiert werden. Bei keiner der Zelllinien zeigten TPA- oder Dexamethason-Behandlung Einfluss auf Expression oder Lokalisation von Trip6. Das Molekulargewicht der Isoformen von Trip6 betrug zwischen 40-55 kDalton.

Dieselbe subzelluläre Verteilung wurde auch in primären Milz- und Thymuszellen von Mäusen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.2 Trip6-Interaktionsstudien

Dass der GR mit Trip6 interagieren kann, ergibt sich aus den *Two-Hybrid*-Experimenten. Meine eben beschriebenen Versuche entdeckten eine Kern-spezifische Isoform, nTrip6, Vorbedingung für eine mögliche Funktion im Zellkern, z.B. in der Transrepression von AP-1 und NF- κ B. Für eine solche Funktion muss Trip6 mit diesen Transkriptionsfaktoren interagieren können.

Die Bindung von Trip6 an GR sowie an die AP-1-Untereinheit cFos und die NF- κ B-Untereinheit RelA/p65 wurde *in vitro* bereits gezeigt (Schneider 2000). Trip6 besitzt an seinem C-Terminus drei Lim-Domänen. Lim-Domänen werden als Protein-Protein-Interaktionsmodule beschrieben (Schmeichel, Beckerle 1994.) Nun soll nachgewiesen werden, ob die Bindung von Trip6 an GR, cFos und RelA/p65 spezifisch über diese Lim-Domänen von Trip6 vermittelt wird.

Da noch nicht geklärt ist, wie sich die Trip6-Isoformen unterscheiden, also wie die nTrip6-Aminosäure-Sequenz aufgebaut ist, wurde im Folgenden mit dem längsten Isolat aus dem *Two-Hybrid Screen* gearbeitet. Diese Isoform Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ umfasst die Aminosäuren 190-476 von Trip6, besitzt kein NES und interagiert mit dem GR.

3.2.1 Trip6 bindet spezifisch über einzelne Lim-Domänen an GR, AP-1 und NF- κ B

Für Interaktions-Experimente wurde die kodierende Sequenz für bestimmte Abschnitte von Trip6 an die kodierende Sequenz des Proteins Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* fusioniert und in löslicher Form in Bakterien exprimiert. Es wurden GST-Fusionsproteine der einzelnen Lim-Domänen sowie Kombinationen aus jeweils zwei Lim-Domänen hergestellt. Abbildung 5 zeigt eine schematische Übersicht.

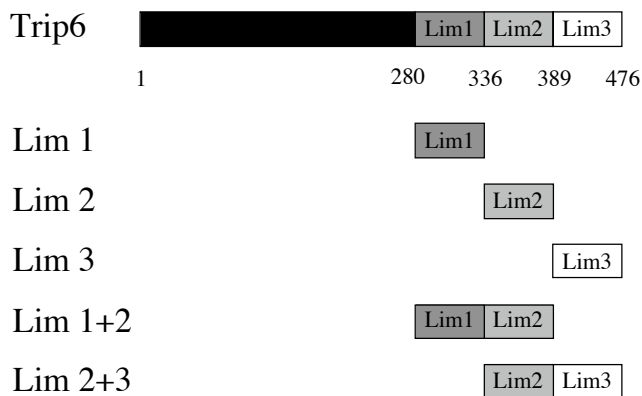


Abb.5: Schematische Darstellung der Lim-Domänen-Konstrukte, die an GST fusioniert wurden

GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bezeichnet das Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem längsten Trip6-Isolat aus dem *Two-Hybrid Screen* (AS 190-476). Lim 1, Lim 2 und Lim 3 bezeichnen die einzelnen Lim-Domänen von Trip6 als Fusionsprotein mit GST. Zusätzlich wurden GST-Fusionsproteine aus Kombinationen der Lim-Domänen hergestellt, und zwar Lim 1 mit Lim 2 (Lim 1+2) und Lim 2 mit Lim 3 (Lim 2+3).

Für den Interaktionstest wurden GST-Trip6-Fusionsproteine an mit Agarose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit den potentiellen Partnerproteinen GR, cFos und RelA/p65 inkubiert. Diese Proteine wurden zuvor in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert. Nach Inkubation erfolgte die Präzipitation der an Agarose gebundenen Trip6-Konstrukte durch Zentrifugation. Fand eine Interaktion statt, so konnte das radioaktiv markierte Protein in diesem Präzipitat detektiert werden. Der Nachweis erfolgte nach einer SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durch Autoradiographie.

Ergebnisse

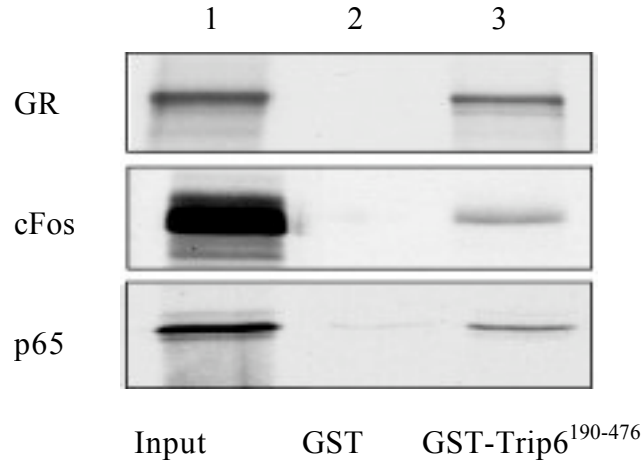


Abb.6: Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ interagiert mit dem GR, cFos und RelA/p65

In Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiertes GR-, cFos- bzw. RelA/p65-Protein wurde durch ein an Glutathion-Agarose immobilisiertes GST-Trip6-Fusionsprotein spezifisch präzipitiert (GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶). Als Kontrolle diente das an Glutathion-Agarose gekoppelte GST-Protein. In Spur 1 wurden 10 % der in den einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge an *in vitro* translatiertem Protein aufgetragen (Input).

Abbildung 6 zeigt das Autoradiogramm des *in vitro* Interaktionstests von GR, cFos und RelA/p65 mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶. Es zeigte sich anhand der radioaktiven Signale in Spur 3 deutlich, dass Trip6 mit dem GR, cFos und RelA/p65 interagiert. Diese Interaktion ist spezifisch, da kein Signal in Spur 2 (GST) zu sehen ist. Als Kontrolle diente die Glutathion-S-Transferase.

Diese *in vitro* translatierten Proteine wurden in einem weiteren Schritt auf Interaktion mit den individuellen Trip6-Lim-Domänen untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

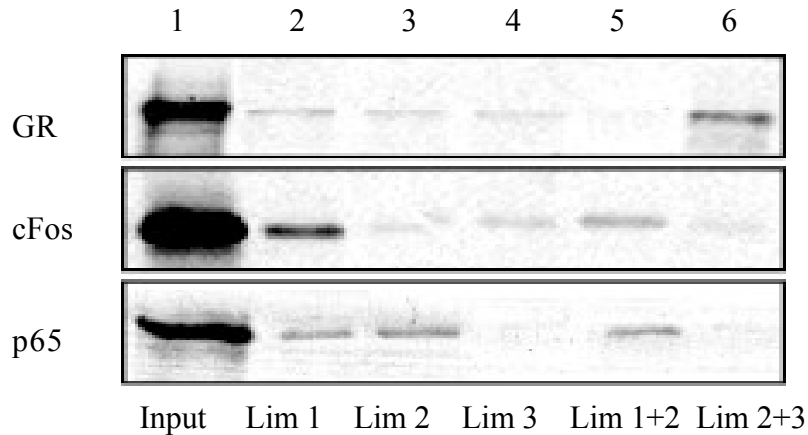


Abb.7: Trip6 interagiert mit dem GR über seine Lim-Domänen 2 und 3 sowie mit cFos bzw. RelA/p65 über seine Lim-Domäne 1

GR, cFos und RelA/p65 wurden in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin *in vitro* translatiert und durch verschiedene an Glutathion-Agarose immobilisierte GST-Trip6-Lim-Domänen-Fusionsproteine präzipitiert. In Spur 1 wurden 10% *in vitro* translatiertes Protein aufgetragen (Input). Dieses diente dem Vergleich der Proteinmengen, die in den einzelnen Interaktionsstudien verwendet wurden. In den Spuren 2, 3 und 4 wurden die GST-Fusionsproteine der einzelnen Lim-Domänen (Lim 1, Lim 2 und Lim 3) verwendet, in Spur 5 die Kombination aus Lim 1 und Lim 2 (Lim 1+2), bzw. in Spur 6 Lim 2 und Lim 3 (Lim 2+3).

Die Interaktion des GR mit den einzelnen Lim-Domänen Lim 1, Lim 2 und Lim 3 war unspezifisch, da sie in der Bandenstärke der Interaktion mit GST (Abbildung 4) entspricht. Sehr deutlich interagiert der GR mit den Lim-Domänen Lim 2+3 von Trip6. Das bedeutet, dass beide Lim-Domänen zur Interaktion mit dem GR benötigt werden.

cFos zeigte deutliche Interaktion mit der Lim-Domäne Lim 1, aber nicht mit den Lim-Domänen Lim 2 und Lim 3. Das Signal der Lim 3 entspricht unspezifischer GST-Bindung. Auch die Kombination der ersten beiden Lim-Domänen Lim 1+2 bindet cFos, was auf die Interaktion der Domäne Lim 1 zurückzuführen ist, da die Kombination aus Lim 2 und Lim 3 ohne Signal blieb. Somit wird die Bindung von Trip6 an cFos über die 1. Lim-Domäne vermittelt.

RelA/p65 interagiert deutlich mit den einzelnen Lim-Domänen Lim 1 und Lim 2 sowie mit einer Kombination aus beiden Domänen. Im Gegensatz zur Bindung mit cFos kann RelA/p65 einzeln

an beide Domänen binden, aber nicht an die Lim-Domäne Lim 3 oder eine Kombination aus Lim 2+3. Das bedeutet, dass eine Bindung von RelA/p65 an die Lim-Domäne Lim 2 aufgrund der Aminosäuresequenz durchaus möglich ist. Im Kontext mit der Lim-Domäne Lim 3 kommt es möglicherweise zu einer Konfigurationsänderung der Interaktionsoberfläche. Damit wäre vielleicht die Bindungsstelle nicht mehr zugänglich. Alternativ wäre denkbar, dass die Trip6-Domäne Lim 1 für die Interaktion mit RelA/p65 notwendig und ausreichend ist, die Interaktion aber zusätzlich über die Domäne Lim 2 stabilisiert wird. Die Interaktion von Trip6 mit RelA/p65 wird auf jeden Fall über die Lim-Domänen 1+2 vermittelt.

Basierend auf diesen *in vitro* Interaktionsstudien kann gesagt werden, dass Trip6 aufgrund seiner speziellen Struktur, bestehend aus drei Lim-Domänen, die als Protein-Protein-Interaktions-Module beschrieben wurden, in der Lage ist, gleichzeitig an den GR sowie die reprimierten Transkriptionsfaktoren AP-1 bzw. NF- κ B zu binden. Es wäre also möglich, dass Trip6 in der GR-vermittelten Transrepression von AP-1 und NF- κ B als Bindeglied wirkt.

3.2.2 Ohne den Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 3 kann Trip6 nicht mehr an den GR binden, dies beeinflusst nicht die Interaktion mit AP-1 oder NF- κ B

Unter Punkt 3. 2. 1 wurde beschrieben, dass Trip6 über die Lim-Domänen Lim 2+3 an den GR bindet, aber keine Interaktion mit den einzelnen Lim-Domänen Lim 2 oder Lim 3 stattfindet. Das bedeutet, beide Lim-Domänen Lim 2 und Lim 3 müssen zur Interaktion anwesend sein. Mutation der Lim-Domäne Lim 3 bzw. Lim 2 würde demnach die Interaktion mit dem GR zerstören. Um dies zu testen, wurde eine Trip6-Mutante hergestellt, die das Trip6-Protein von Aminosäure 190 bis 476 repräsentiert, aber aufgrund von vier Punktmutationen der Zinkfinger-koordinierenden Aminosäuren der Lim-Domäne Lim 3 keine Lim 3-Zinkfinger mehr ausbilden kann.

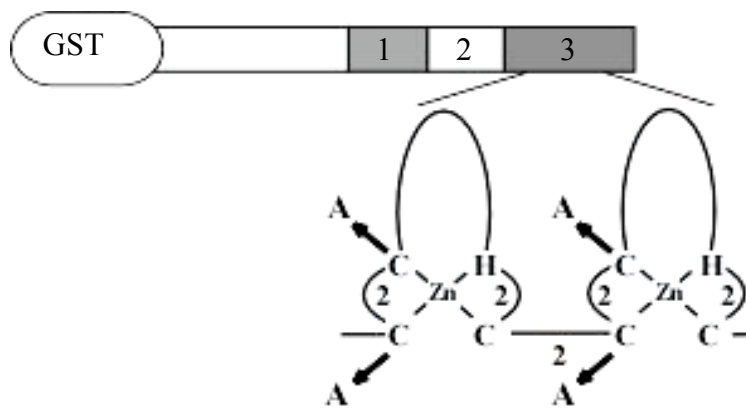


Abb.8: Schematische Darstellung der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m als GST-Fusionsprotein

Trip6 besitzt im C-Terminus drei Lim-Domänen. Jede Lim-Domäne besteht aus zwei Zinkfingern. Dies wird in dieser Abbildung für die Lim-Domäne 3 dargestellt. In der Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m wird Trip6 von Aminosäure 190-476 verwendet. Zusätzlich wurden die vier Zinkfinger (Zn) - koordinierenden Cysteine (C) gegen Alanin (A) ausgetauscht (C→A). Dieses mutierte Trip6-Protein wurde an GST fusioniert.

Die Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m wurde für den Interaktionstest, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, an mit Agarose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit den *in vitro* translatierten potentiellen Partnerproteinen GR, cFos und RelA/p65 auf Interaktion untersucht.

Ergebnisse

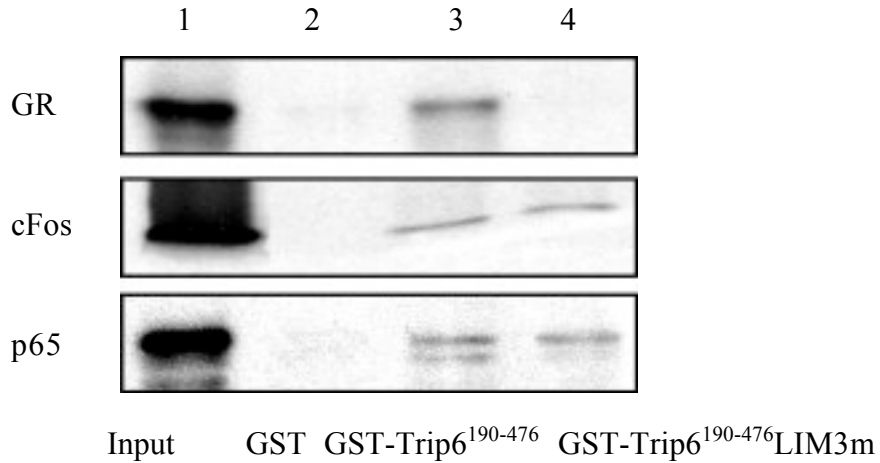


Abb.9: Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m kann nicht mehr mit dem GR interagieren, aber mit cFos und RelA/p65

GR, cFos und RelA/p65 wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert und durch an Glutathion-Agarose-immobilisiertes GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bzw. GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ Lim3m-Fusionsprotein präzipitiert. Als Negativkontrolle wurde in Spur 2 (GST) das an Agarose gekoppelte GST-Protein verwendet. In Spur 1 wurden 10% an *in vitro* translatiertem Protein aufgetragen (Input). Spur 3 zeigt die Interaktion der *in vitro* translatierten Proteine mit dem GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ Fusionsprotein als Positivkontrolle, Spur 4 die Interaktion mit der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ Lim3m.

Der GR, cFos und RelA/p65 interagierten deutlich mit Trip6, wie bereits im Versuch 3. 2. 1 dargestellt. Diese Bindungen waren spezifisch, da mit dem GST-Protein keine Interaktion stattfand (Spur 2). cFos und RelA/p65 interagierten außerdem mit der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim3m, jedoch nicht der GR (Spur 4).

Die Daten der Abbildung 9 beweisen, dass die Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 3 von Trip6 zur Interaktion mit dem GR benötigt werden, aber nicht zur Bindung an cFos oder RelA/p65.

3.2.3 Ohne den Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 1 kann Trip6 nicht mehr an AP-1 oder NF- κ B binden, dies beeinflusst nicht die Bindung an den GR

In Kapitel 3. 2. 1 wurde beschrieben, dass die Lim-Domäne Lim 1 von Trip6 zur Interaktion mit cFos sowie mit RelA/p65 benötigt wird. Nur Trip6-Lim-Domänen-Konstrukte, die diese spezielle Domäne besaßen, konnten mit cFos bzw. RelA/p65 interagieren. Das Fehlen der Lim-Domäne Lim 1 sollte die Interaktion zerstören. Um dies zu überprüfen, wurde eine Mutante hergestellt, die das Trip6-Protein von Aminosäure 190 bis 476 repräsentiert, aber aufgrund von vier Punktmutationen der Zinkfinger-koordinierenden Aminosäuren der 1. Lim-Domäne keine Lim 1-Zinkfinger mehr ausbilden kann.

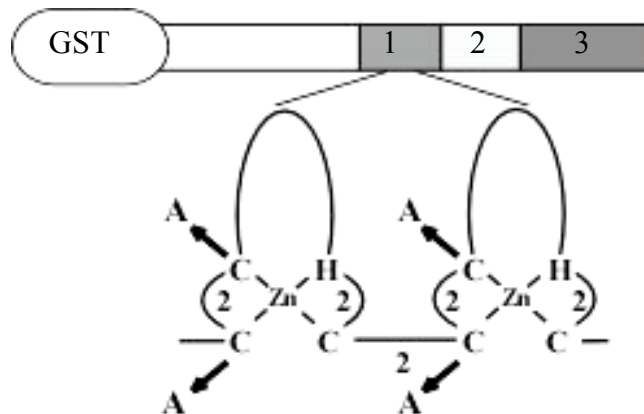


Abb.10: Schematische Darstellung der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m als GST-Fusionsprotein

In dieser Abbildung wurden die zwei Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 1 detailliert dargestellt. Für das Fusionsprotein GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m wurde Glutathion-S-Transferase an die Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m fusioniert. Diese Mutante entspricht dem Protein Trip6 von Aminosäure 190-476, zusätzlich wurden die vier Zinkfinger (Zn) - koordinierenden Cysteine (C) der Lim-Domäne Lim 1 gegen Alanin (A) ausgetauscht (C→A).

Die Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m wurde für den Interaktionstest, wie unter 3. 2. 1 beschrieben, an mit Agarose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit den *in vitro* translatierten potentiellen Partnerproteinen GR, cFos und RelA/p65 auf Interaktion untersucht.

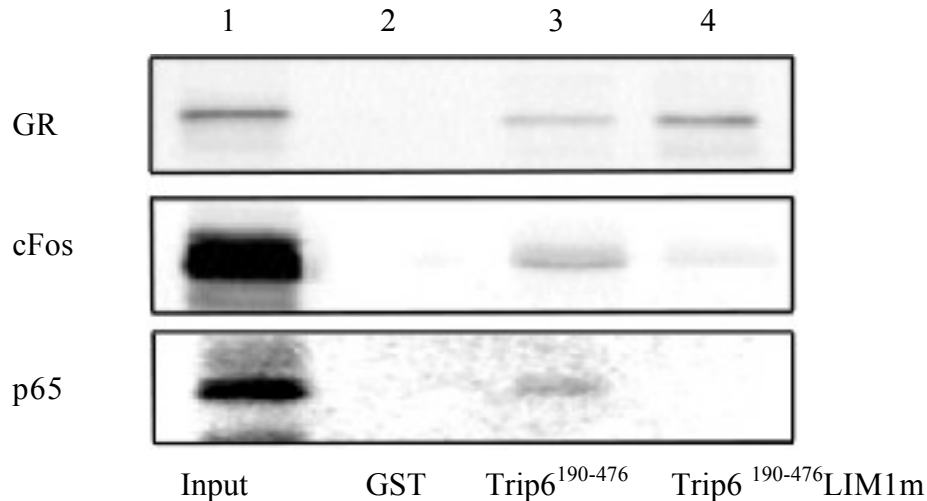


Abb.11: Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m kann nicht mehr mit cFos und RelA/p65 interagieren, aber mit dem GR

GR, cFos und RelA/p65 wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert und durch an Glutathion-Agarose immobilisiertes GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bzw. GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m-Fusionsprotein präzipitiert. Als Negativkontrolle wurde in Spur 2 (GST) das an Agarose gekoppelte GST-Protein verwendet, in der 1. Spur wurden 10% an *in vitro* translatiertem Protein (Input). Spur 3 zeigt als Positivkontrolle die Interaktion der *in vitro* translatierten Proteine mit dem GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Fusionsprotein, Spur 4 die Interaktion mit der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim 1.

Durch die Daten in Abbildung 9 wurde bewiesen, dass die Bindung von Trip6 mit AP-1 und NF-κB über die Lim-Domäne Lim 1 verläuft. Diese Domäne wird zur GR-Bindung nicht gebraucht.

Der GR, cFos und RelA/p65 interagierten mit Trip6 wie bereits in dem Versuch 3. 2. 1. Diese Interaktion war spezifisch, da das GST-Protein keine Bindung mit diesen Proteinen einging (Spur 2). Der GR interagiert außerdem mit der Trip6-Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m, jedoch nicht cFos sowie RelA/p65 (Spur 4). Dies bedeutet, dass die Zinkfinger der Lim-Domäne Lim 1 von Trip6 die Interaktion mit cFos und RelA/p65 vermitteln, diese Zinkfinger werden zur Bindung von Trip6 an GR nicht benötigt.

Zusammenfassend: Trip6 ist ein Protein mit drei spezifischen Protein-Protein-Interaktionsmodulen in seinem C-Terminus, den sogenannten Lim-Domänen. Jede dieser Domänen zeigt eine Spezifität in ihrer Bindung zu Partnerproteinen. Die Trip6-Lim-Domäne

Lim1 ist in der Lage mit Mitgliedern der GR-reprimierten Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B zu interagieren. Die Trip6 Lim-Domäne Lim 3 dagegen bindet spezifisch an den GR, der die Transrepression vermittelt. Ohne die Zinkfinger dieser Domänen ist keine Bindung möglich. Trip6 wäre also aufgrund seiner speziellen Struktur in der Lage als Bindeglied im Transrepressionsprozess zu wirken.

3.3 Promotorstudien

Die bisher beschriebenen Bindungsstudien bewiesen, dass Trip6 *in vitro* über spezifische Lim-Domänen an den GR, cFos sowie RelA/p65 binden kann und somit grundsätzlich in der Lage ist, als Bindeglied zwischen dem GR und den reprimierten Transkriptionsfaktoren AP-1 bzw. NF- κ B zu fungieren. Nun soll überprüft werden, ob diese Proteine im Komplex auf dem Promotor von Zielgenen zu finden sind. Dies wird mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation ermittelt.

3.3.1 nTrip6 ist unter aktivierenden und reprimierenden Bedingungen am Promotor von NF- κ B-regulierten Zielgenen lokalisiert

Ziel ist es zu beweisen, dass der Komplex aus GR, RelA/p65 und nTrip6 *in vivo* auf dem Promotor des von NF- κ B regulierten Zielgens Interleukin8 (Il-8) lokalisiert ist. Dazu wurden HeLa-Zellen unbehandelt verwendet, bzw. mit TNF α behandelt, um den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren. Parallel dazu wurden TNF α -induzierte HeLa-Zellen mit Dexamethason behandelt, um den GR zu aktivieren und den aktivierten Transkriptionsfaktor NF- κ B zu reprimieren. Nach Induktion erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Formaldehyd (*Crosslinking*). Diese Verbindung verknüpft Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Kontakte. Die Zellen wurden geerntet, die DNA, an der die Transkriptionsfaktoren nun fest gebunden waren, durch Ultraschalleinwirkung geschert und RelA/p65-, nTrip6- und GR-enhaltende Chromatin-Fragmente mit spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Nach Lösen der Interaktionen (*Decrosslinking*) und Verdau der Proteine wurde über PCR die NF- κ B-Promotorsequenz des Il-8-

Zielgens amplifiziert, welche die potentielle Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren enthält. Wird die Amplifikation unter Bedingungen durchgeführt, in welchen die erhaltene DNA-Menge linear mit der eingesetzten Promotorsequenz ansteigt, gibt die PCR-Reaktion die präzipitierte Sequenz wieder und damit die Menge an Promotor-gebundenem Protein.

Negativkontrolle war die Amplifikation einer Sequenz im snRNA-Promotor ohne GR-, RelA/p65- oder nTrip6-Erkennungssequenz. Zum Nachweis, dass die Bindung der Transkriptionsfaktoren direkt am Promotor stattfindet, wurde eine Sequenz amplifiziert, die sich im kodierenden Bereich des Il-8-Gens befindet. Außerdem diente die Immunopräzipitation eines immunologisch inaktiven Immunglobulins (IgG) als Negativkontrolle. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Präzipitation des Chromatins aus einer unspezifischen Interaktion zwischen ungerichteten IgG-Ketten des Antikörpers mit den Zielproteinen resultiert.

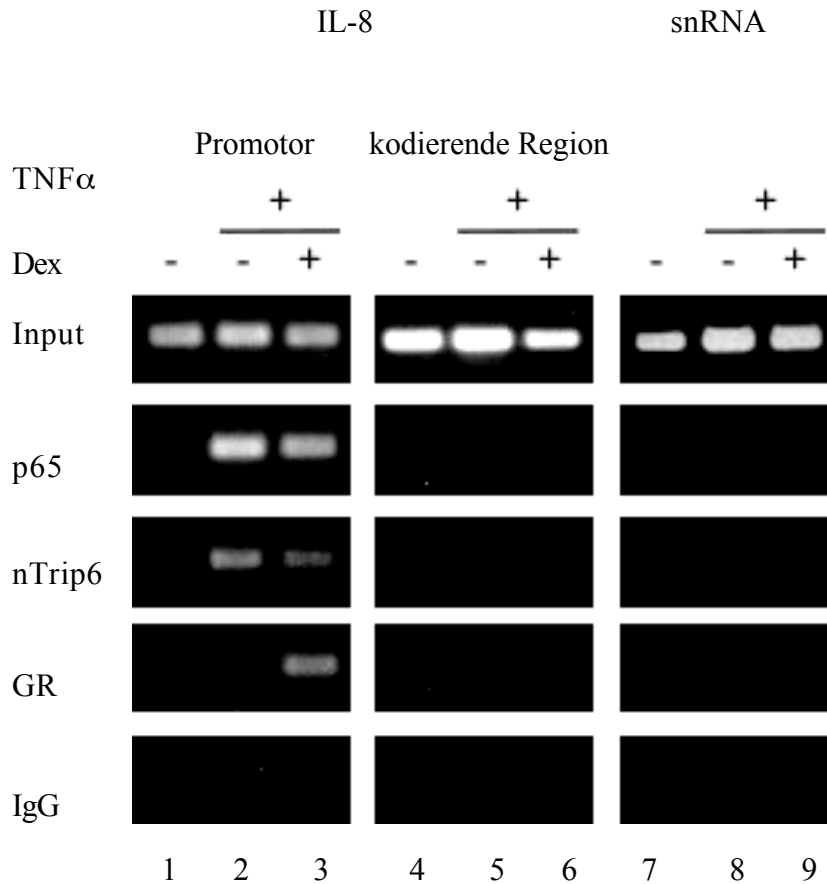


Abb.12: Promotorbesetzung des NF- κ B-regulierten Interleukin 8-Gens (IL-8)

Chromatin-Immunopräzipitation wurde mit unbehandelten sowie TNF α - (10ng/ml für 3 Stunden) bzw. Dexamethason- (Dex; 10^{-7} M, 1 Stunde) behandelten HeLa-Zellen durchgeführt. Nach Immunopräzipitation von RelA/p65, GR und nTrip6 mit spezifischen Antikörpern wurde über PCR die Lokalisation dieser Proteine auf dem Promotor bzw. einer kodierenden Region des IL-8-Gens amplifiziert. Negativkontrolle war ein Isotyp-Antikörper (IgG). Zusätzlich erfolgte Amplifikation der Promotorsequenz des snRNA-Gens, welches nicht von RelA/p65, GR oder nTrip6 reguliert wird. In Spur 1, 4 und 7 ist jeweils die Promotor-Besetzung nicht induzierter Zellen zu sehen, in Spur 2, 5 und 8 TNF α -induzierter Zellen und in Spur 3, 6 und 9 TNF α -induzierter Zellen, die zusätzlich Dexamethason-behandelt wurden. Input bezeichnet DNA von Chromatin und wurde als Kontrolle vor der Immunopräzipitation abgenommen.

Keiner der Transkriptionsfaktoren war in unstimulierten Zellen am Promotor lokalisiert (Spalte 1). Erst nach Aktivierung mit TNF α erfolgte Bindung von RelA/p65 und nTrip6 (Spalte 2). Nach Behandlung mit Dexamethason konnte der GR am Promotor detektiert werden, nTrip6 und RelA/p65 blieben gebunden. Die Bindung dieser Proteine war spezifisch für den IL-8-Promotor,

keines der Proteine konnte in der kodierenden Region oder auf dem Promotor des snRNA-Gens amplifiziert werden. Die Antikörper erkannten ihr jeweiliges Protein, die IgG-Negativkontrolle zeigte keinerlei Signal.

Die Ergebnisse in Abbildung 12 beweisen, dass der Transkriptionsfaktor RelA/p65 erst nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ an den Promotor gebunden ist und der GR nur nach Dexamethason-Behandlung. nTrip6 ist unter reprimierten Bedingungen am Promotor lokalisiert. RelA/p65 wird nicht vom GR verdrängt, sondern bleibt am Promotor gebunden. Überraschend war, dass nTrip6 auch in aktivierten Bedingungen am Promotor bindet, genau wie RelA/p65.

Es kann keine Aussage getroffen werden, ob nTrip6 zusammen mit RelA/p65 am Promotor lokalisiert ist oder ob in reprimierenden Bedingungen ein Komplex aus nTrip6, RelA/p65 und dem GR vorliegt. Möglicherweise wurden verschiedene Sequenz-Populationen von Promotor-Besetzungen gemessen, die einmal RelA/p65, einmal den GR gebunden haben.

3.3.2 nTrip6 ist unter aktivierenden und reprimierenden Bedingungen am Promotor von AP-1-regulierten Zielgenen lokalisiert

Die Versuchsbedingungen entsprachen den in Kapitel 3. 4. 1 beschriebenen. Untersucht wurde die Lokalisation von GR, cFos und nTrip6 auf dem Promotor des von AP-1-regulierten Zielgens KollagenaseI. Um AP-1 zu aktivieren, wurden HeLa-Zellen mit dem Phorbolster TPA behandelt, die Repression erfolgte auch hier mit Dexamethason.

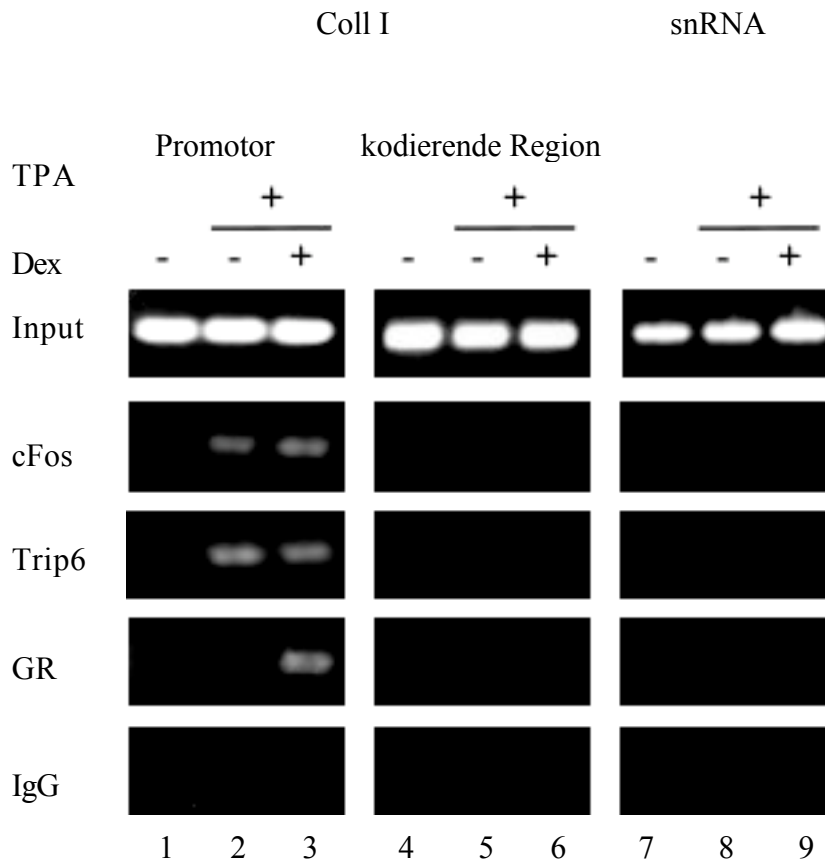


Abb.13: Promotorbesetzung des AP-1-regulierten KollagenaseI-Gens (Coll-I)

Bei dieser Chromatin-Immunopräzipitation wurde über PCR die Lokalisation von cFos, GR und nTrip6 nach Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern auf dem Promotor bzw. der kodierenden Region des KollagenaseI Gens amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde ein Isotyp-Antikörper (IgG) verwendet, weitere Negativkontrolle war die Promotorsequenz des Gens snRNA. Dieses Gen wird nicht von cFos, GR oder nTrip6 reguliert. In Spur 1, 4 und 7 ist die Promotor-Besetzung nicht induzierter HeLa-Zellen dargestellt, in Spur 2, 5 und 8 TPA-induzierter Zellen (50ng/ml, 3 Stunden) und in Spur 3, 6 und 9 TPA-induzierter Zellen, die zusätzlich mit Dexamethason behandelt wurden ($10^{-7}M$, 1 Stunde). Der Input enthält DNA von Chromatin und wurde als Ladekontrolle vor der Immunopräzipitation abgenommen.

Weder der GR noch nTrip6 oder cFos sind in unbehandelten Kontrollzellen am Promotor gebunden (Spalte 1). Die Induktion mit TPA bewirkt, dass cFos und nTrip6 (Spalte 2) an den Promotor binden. Nach Behandlung mit Dexamethason befinden sich cFos und nTrip6 immer noch am Promotor, sowie der GR (Spalte 3). Es erfolgt keine Bindung dieser drei Proteine an die kodierende Region des KollagenaseI-Gens, den snRNA-Promotor oder an den IgG-Isotyp-Antikörper.

Die Verhältnisse am KollagenaseI-Promotor (Abbildung 13) ähneln denen am Il-8-Promotor (Abbildung 12). Wie erwartet bindet der aktivierende Transkriptionsfaktor cFos erst nach Stimulation mit TPA an den Promotor. Der GR muss zuerst mit Dexamethason aktiviert werden und ist nur unter reprimierten Bedingungen an der DNA lokalisiert. cFos wurde dabei nicht vom GR verdrängt, sondern blieb bei der Repression an den Promotor gebunden. Wieder war nTrip6 bereits in aktivierten Bedingungen zusammen mit cFos präsent.

Auch bei diesem Experiment kann keine Aussage gemacht werden, ob nTrip6 zusammen mit cFos am KollagenaseI-Promotor gebunden ist oder ob in reprimierenden Bedingungen ein Komplex aus nTrip6, cFos und GR vorliegt. Es könnte sich bei den gemessenen Daten durchaus um verschiedene Populationen von Promotoren handeln, bei denen einmal AP-1 mit nTrip6 assoziiert ist oder auch der GR mit nTrip6.

Es konnte gezeigt werden, dass nTrip6, cFos und GR (KollagenaseI) bzw. nTrip6, RelA/p65 und GR (Il-8) auf den reprimierten Promotoren von Zielgenen lokalisiert sind. Noch unklar ist, ob diese Proteine auf ein und demselben Promotormolekül versammelt sind.

3.3.3 Der Komplex aus cFos, nTrip6 und GR befindet sich auf ein und demselben Promotormolekül

Ziel dieses Versuches ist es zu erkennen, ob cFos, nTrip6 und GR als Komplex auf ein und demselben Promotormolekül des KollagenaseI-Gens lokalisiert sind. Die Versuchsdurchführung, wie in Kapitel 3. 4. 2 beschrieben, kann dies nicht garantieren. Es wäre gut möglich, dass verschiedene Subpopulationen von Promotor-Besetzungen nachgewiesen wurden. Deshalb wird

eine Chromatin-Doppel-Immunopräzipitation durchgeführt. Zellen werden, wie bereits beschrieben, behandelt, mit Formaldehyd fixiert, geerntet und mit Ultraschall zerkleinert. Danach erfolgt ausschließlich Immunopräzipitation gegen cFos. Der so isolierte cFos enthaltende Komplex wird anschließend eluiert und einer 2. Immunopräzipitation gegen GR bzw. nTrip6 unterworfen. Erst dann erfolgt das Auflösen der immunopräzipitierten Komplexe, der Verdau der Proteine und eine PCR, bei der die AP-1-Promotorsequenz des KollagenaseI-Zielgens amplifiziert wird. Nur wenn der GR bzw. nTrip6 mit cFos zusammen auf dem Promotor gebunden sind, kann die Promotorsequenz im Präzipitat vorliegen und amplifiziert werden.

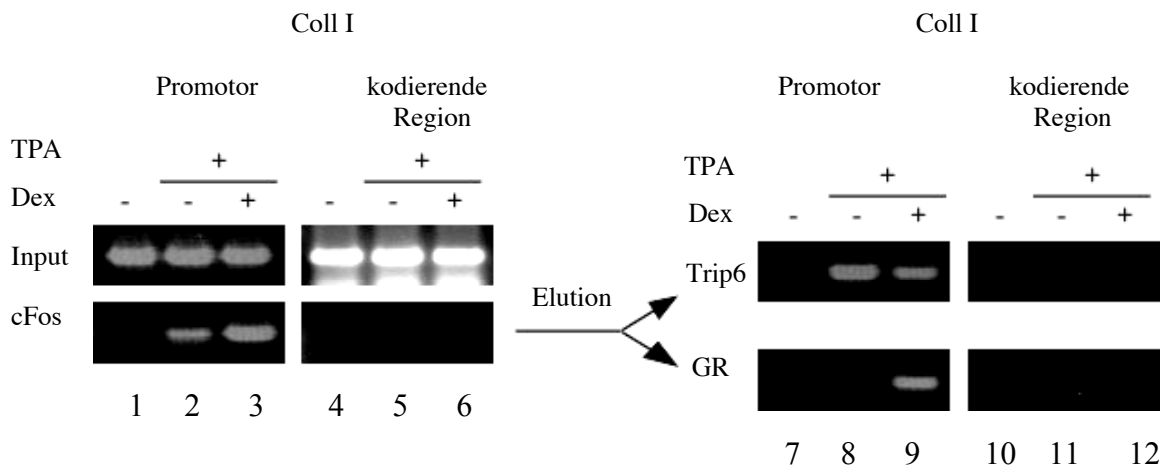


Abb.14: nTrip6 und GR befinden sich im Komplex mit cFos auf ein und demselben Promotormolekül der KollagenaseI

Über Chromatin-Doppel-Immunopräzipitation wird die Lokalisation von nTrip6 und GR auf einem Promotor des KollagenaseI-Gens bestimmt, an dem bereits cFos gebunden ist. Doppel-Chromatin-IP bedeutet, dass nach einer ersten Immunopräzipitation mit einem spezifischen cFos-Antikörper (linke Abbildung) der cFos enthaltene Komplex eluiert (*Elution*) und einer weiteren Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen GR und nTrip6 unterworfen wurde (rechte Abbildung). Als Negativkontrolle erfolgte Amplifikation der Promotorsequenz des Gens snRNA, das nicht von cFos, GR oder nTrip6 reguliert wird. In Spur 1 ist die Promotor-Besetzung nicht induzierter HeLa-Zellen zu sehen, in Spur 2 TPA-induzierter Zellen und in Spur 3 TPA-induzierter Zellen, die zusätzlich mit Dexamethason behandelt wurden. Der Input wurde als Ladekontrolle vor der Immunopräzipitation abgenommen.

cFos befand sich im aktivierten sowie reprimierten Zustand am Promotor. Nach Elution dieses cFos enthaltenden Komplexes und erneuter Immunopräzipitation gegen nTrip6 bzw. GR konnte bewiesen werden, dass nTrip6 in aktivierten sowie reprimierten Bedingungen zusammen mit cFos am Promotor lokalisiert ist. Der GR befindet sich ausschließlich in Dexamethason-behandelten Zellen zusammen mit cFos auf dem Promotor.

In der Chromatin-Doppel-IP konnte aufbauend auf die Chromatin-IP bewiesen werden, dass nach TPA-Induktion nTrip6 zusammen mit cFos am Promotor des von AP-1 regulierten KollagenaseI-Gens lokalisiert ist. Auch nach Behandlung mit Dexamethason sind beide Proteine zusammen an den Promotor gebunden, zusätzlich befindet sich der GR zusammen mit cFos im Komplex.

nTrip6 ist bei der Aktivierung sowie der Repression der Aktivität von NF- κ B- bzw. AP-1-regulierten Zielgenen an den Promotor gebunden. Ob nTrip6 eine funktionelle Rolle in der Aktivierung und Repression von NF- κ B bzw. AP-1 spielt, wird nun untersucht.

3.4 Funktion von Trip6

Trip6 interagiert *in vitro* mit den Proteinen, die an Aktivierung bzw. Repression von AP-1- bzw. NF- κ B-regulierten Zielgenen beteiligt sind. Der Komplex aus nTrip6, cFos bzw. nTrip6, RelA/p65 ist in aktivierenden bzw. zusammen mit dem GR in reprimierenden Bedingungen *in vivo* auf der Promotorregion dieser Gene zu finden. Im Folgenden soll untersucht werden, ob nTrip6 für die Transrepression durch den GR benötigt wird und unerlässlich ist.

Um zu prüfen, ob nTrip6 zur Repression von NF- κ B- bzw. AP-1-Zielgenen durch Glukokortikoide benötigt wird, wurde mit Hilfe von siRNA die Trip6-Menge pro Zelle reduziert („*loss of function*“). Die Reduktion wurde durch Westernblot quantifiziert und getestet, ob die Zielgenexpression durch Hormongabe noch reprimiert werden kann. Anschließend wurde mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation die Promotorbesetzung der Zielgene in den Zellen mit reduzierter Trip6-Menge untersucht.

Es soll untersucht werden, ob nTrip6 zur Repression tatsächlich benötigt wird, z.B. um den GR an den Promotor zu binden. Dazu wird der Proteingehalt von Trip6 in HeLa-Zellen durch Transfektion spezifischer si-Trip6-Oligomere reduziert (*silencing*). Der Proteingehalt von Trip6 wird im Westernblot quantifiziert, anschließend werden diese Zellen funktionell auf ihre Repressionsfähigkeit überprüft. Schließlich wird mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation die Promotorbesetzung untersucht.

3.4.1 Der Proteingehalt von Trip6 kann spezifisch reduziert werden

Zur spezifischen Reduktion des Proteingehalts von Trip6 wurden si-Trip6-Oligomere in HeLa-Zellen transfiziert, die Zellen geerntet und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Nach Westernblot erfolgte der Nachweis des Trip6-Proteins mit Hilfe des polyklonalen Trip6-Antiserums.

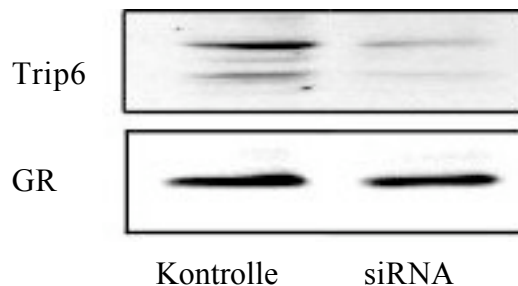


Abb.15: Die Proteinmenge aller Trip6-Isoformen kann spezifisch reduziert werden

Es wurden Gesamtzellextrakte von 1×10^5 nicht induzierten HeLa-Zellen gewonnen, deren Trip6-Proteingehalt mit spezifischen Trip6-siRNA-Oligomeren reduziert wurde (siRNA). Parallel wurden Gesamtzellextrakte von Kontrollzellen extrahiert (Kontrolle) und mit einem nicht spezifischen siRNA-Oligomer transfiziert. Je 1/20 der Extrakte wurde einer SDS-PAGE unterworfen und das Trip6-Protein durch Westernblot-Analyse mit Hilfe eines polyklonalen Trip6-Kaninchenantiserums detektiert (Trip6). Gleichzeitig wurde die Membran zur Spezifität sowie Ladekontrolle mit einem GR-Antikörper versetzt (GR) und die GR-Menge gemessen.

Nach Transfektion der HeLa-Zellen mit spezifischen si-RNA-Oligomeren findet eine gut sichtbare Reduktion der Trip6-Proteinmenge statt. Dies ist zu sehen an den deutlich schwächeren immunreaktiven Banden der siRNA-behandelten Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen. Die Gesamt-Proteinmenge an Glukokortikoidrezeptor ist davon nicht betroffen, diese Bandenintensität ist nach Transfektion mit spezifischen si-Trip6-RNA-Oligomeren unverändert. Der Proteingehalt von Trip6 kann also spezifisch reduziert werden. Dies beeinflusst den Gesamtproteingehalt von GR in diesen Zellen nicht. Es ist deutlich zu sehen, dass alle drei Isoformen von Trip6 von der Reduktion betroffen sind. Dies ist ein Beweis, dass die nTrip6-Bande tatsächlich Trip6 widerspiegelt und nicht aufgrund von unspezifischen Kreuzreaktionen des Antikörpers auftritt.

3.4.1.1 Ohne Trip6 kann keine GR-vermittelte Repression von AP-1- und NF- κ B-Zielgenen mehr stattfinden

Um die Frage zu klären, ob Trip6 zur Repression der transkriptionellen Aktivität des durch AP-1-regulierten Zielgens KollagenaseI tatsächlich benötigt wird, wurden HeLa-Zellen, deren Trip6-Proteingehalt spezifisch reduziert wurde, funktionell untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 in diesen Zellen mit TPA aktiviert und anschließend mit Dexamethason reprimiert. Danach erfolgte die Isolation der Gesamtzell-RNA dieser Zellen und die Bestimmung der Menge an KollagenaseI-mRNA, im Vergleich zu Kontrollzellen, deren Trip6-Proteingehalt nicht reduziert wurde.

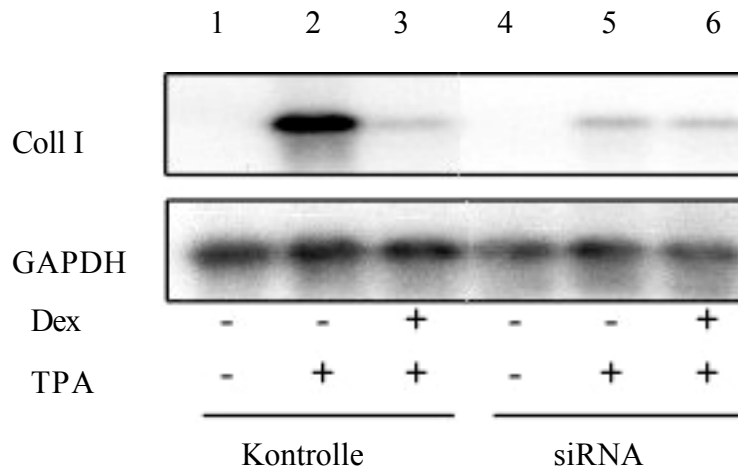


Abb.16: Trip6 wird benötigt zur Repression der KollagenaseI durch Glukokortikoide

Semikonfluente HeLa-Zellen wurden für 6 Stunden mit TPA +/- Dexamethason behandelt. Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA extrahiert. Dabei wurden Kontrollzellen verwendet (Kontrolle) oder Zellen, deren Trip6-Gehalt spezifisch reduziert wurde, wie unter Abb.15 beschrieben (siRNA). Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde die KollagenaseI-mRNA durch RNA-cDNA-Hybridisierung mit einer KollagenaseI-spezifischen α^{32} P-markierten cDNA-Sonde detektiert. Als Ladekontrolle diente eine α^{32} P-markierte GAPDH-cDNA-Sonde.

Bei Kontrollzellen ist nach Behandlung mit TPA das Vorhandensein von KollagenaseI-mRNA (Spur 2) zu erkennen, im Gegensatz zu nicht induzierten Zellen (Spur 1). Die Menge an gebildeter KollagenaseI-mRNA konnte durch Dexamethason-Behandlung deutlich reduziert werden (vergleiche Spur 3 mit Spur 2). In Zellen mit reduzierter Trip6-Menge wurde quantitativ deutlich

weniger KollagenaseI-mRNA gebildet (Vergleich Spur 5 mit Spur 2), Dexamethason führte aber zu keiner weiteren Reduktion (Vergleich Spur 6 mit Spur 5).

In Abbildung 16 ist deutlich zu sehen, dass TPA-Behandlung zur Aktivierung des von AP-1 regulierten KollagenaseI-Gens führt und diese Aktivierung durch Dexamethason reprimiert werden kann. Für diesen Prozess wird Trip6 benötigt. Einerseits als Kofaktor, denn die Aktivierung der KollagenaseI verläuft weniger effizient in Zellen mit reduziertem Trip6-Gehalt. Andererseits wird Trip6 zur Repression der AP-1-vermittelten Genaktivität der KollagenaseI benötigt, da in Trip6-reduzierten Zellen nach GR-Aktivierung keine Repression des KollagenaseI-Gens mehr stattfindet.

Auf gleiche Weise wird dies für das durch NF- κ B regulierte Gen Interleukin 8 untersucht. Nach Isolation der Gesamtzell-RNA wird die Menge an Interleukin 8-mRNA in Kontrollzellen bestimmt, im Vergleich zu Zellen, deren Trip6-Proteingehalt reduziert wurde.

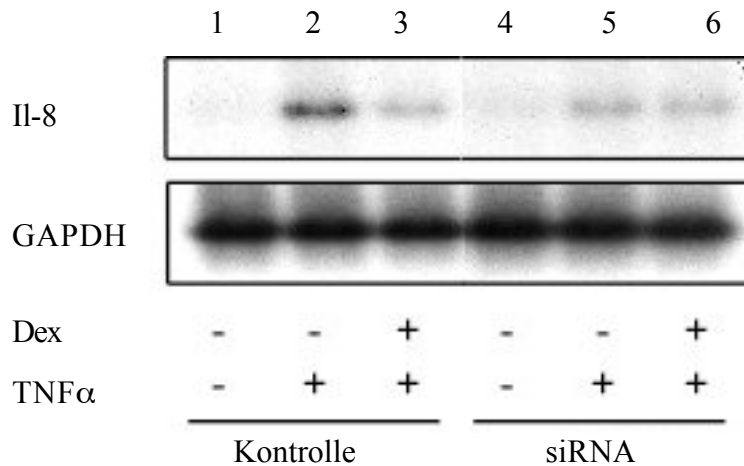


Abb.17: Trip6 wird benötigt zur Repression von Interleukin 8 durch Glukokortikoide

Semikonfluente HeLa-Zellen wurden für 3 Stunden mit TNF α +/- Dexamethason behandelt. Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA extrahiert. Dabei wurden nicht behandelte Kontrollzellen verwendet (Kontrolle) oder Zellen mit spezifisch reduziertem Trip6-Gehalt wie unter Abb.15 beschrieben (siRNA). Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde die Interleukin 8-mRNA durch RNA-cDNA-Hybridisierung mit einer Interleukin 8-spezifischen α^{32} P-markierten cDNA-Sonde detektiert. Als Ladekontrolle diente α^{32} P-markierte GAPDH-cDNA.

Die Kontrollzellen bildeten nach Behandlung mit TNF α Interleukin 8-mRNA (Spur 2), jedoch nicht die uninduzierten Zellen (Spur 1). Diese Bildung konnte durch Dexamethason-Behandlung deutlich gehemmt werden (Spur 3). In Zellen mit reduziertem Trip6-Proteingehalt (siRNA) wurde quantitativ deutlich weniger Interleukin 8-mRNA gebildet (Vergleich Spur 5 mit Spur 2). Dexamethason führte zu keiner weiteren Reduktion (Vergleich Spur 6 mit Spur 5).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Trip6 zur Aktivierung des NF- κ B-regulierten Gens Interleukin 8 benötigt wird und auch zur Reduktion dieser Aktivierung durch den GR. In HeLa-Zellen mit spezifisch reduziertem Trip6-Proteingehalt erfolgt im Vergleich zu Kontrollzellen eine sehr schwache Aktivierung von Interleukin 8 nach TNF α -Stimulation. In diesen Zellen ist die Repression der Expression durch Glukokortikoide nicht mehr möglich.

3.4.2 Ohne nTrip6 kann der GR nicht mehr an den Promotor binden

Aus dem vorhergehenden Experiment ging hervor, dass Trip6-reduzierte Zellen nicht mehr zur Repression in der Lage sind, aber nicht, warum sie das nicht können. Eine Möglichkeit wäre, dass nTrip6 im Zellkern als molekulare Plattform wirkt, durch die der GR an den Promotor binden kann und dort seine Repressionsfähigkeit vermittelt.

Aus diesem Grund wurde die Promotorbesetzung des AP-1-regulierten Gens KollagenaseI in Zellen mit spezifisch reduziertem Trip6-Proteingehalt untersucht. Dazu wurde die Chromatin-Immunopräzipitation angewandt. Das Experiment wurde, wie in Kapitel 3. 3. 2 beschrieben, durchgeführt.

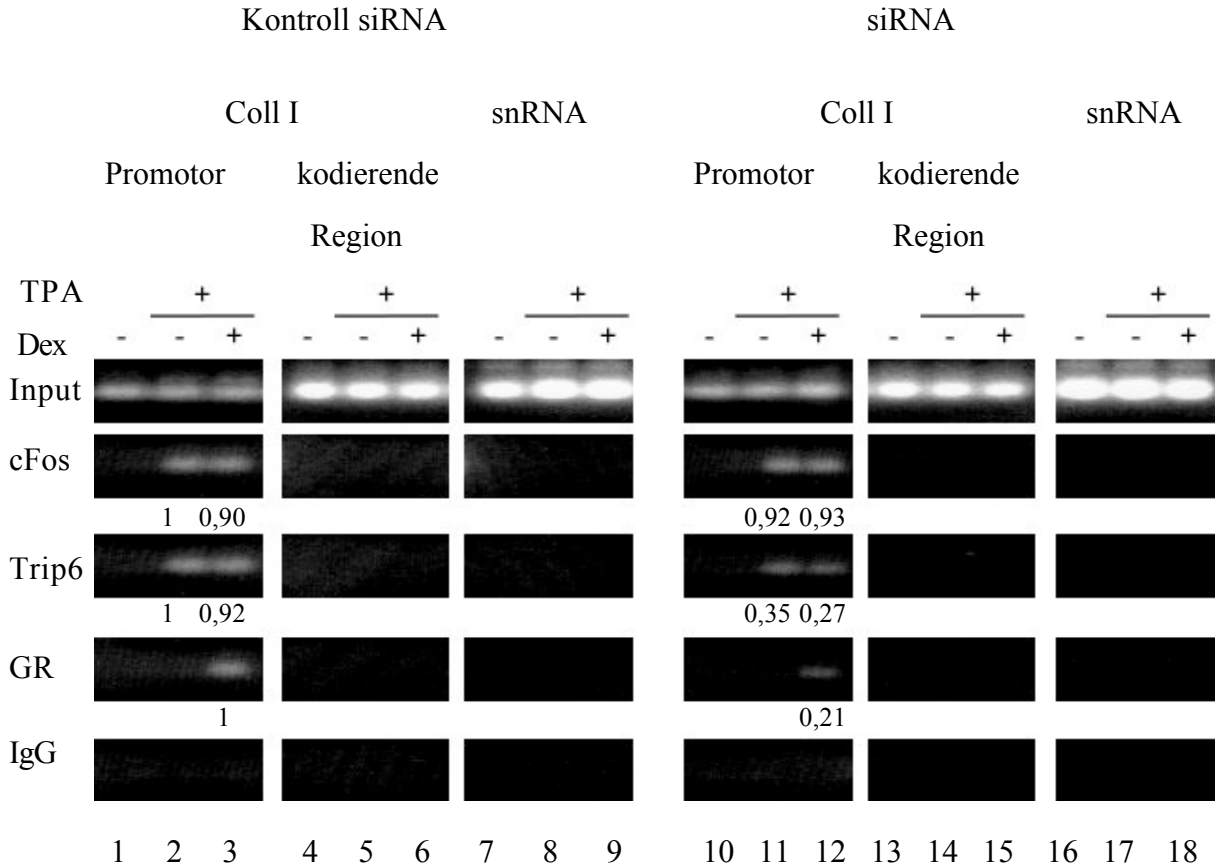


Abb.18: Ohne nTrip6 kann der GR nicht mehr an den Promotor binden

Mit Chromatin-Immunopräzipitation wurde die Lokalisation von cFos, GR und nTrip6 auf dem Promoter des KollagenaseI-Gens amplifiziert. Als Vergleich dienten Kontrollzellen (Kontroll siRNA) und Zellen, deren Trip6-Menge spezifisch reduziert wurde (siRNA). Die Intensität der Banden wurde quantifiziert. Die Berechnung erfolgte prozentual zur Intensität der Menge an cFos, die nach Induktion der Zellen mit TPA am Promotor gebunden war. Als Negativkontrolle erfolgte die Untersuchung der Promotorbesetzung des Gens für snRNA, das von cFos, GR oder nTrip6 nicht reguliert wird. Um sicher zu gehen, dass die Bindung der Faktoren spezifisch am Promotor stattfindet, wurde die PCR auch mit Primern durchgeführt, die einen kodierenden Bereich der KollagenaseI amplifizieren. Der IgG-Antikörper wurde verwendet, um unspezifische Antikörperreaktionen auszuschließen. In Spur 1, 4, 7 und 10, 13, 16 ist bei Kontrollzellen und Trip6-reduzierten Zellen die Promotor-Besetzung nicht induzierter HeLa-Zellen zu sehen, in Spur 2, 5, 8 und 11, 14, 17 die TPA-induzierter Zellen und in Spur 3, 6, 9 und 12, 15, 18 die TPA-induzierter Zellen, die zusätzlich mit Dexamethason behandelt wurden. Der Input wurde als Kontrolle vor der Immunopräzipitation abgenommen.

Die Reduktion von Trip6 hatte keinen Einfluss auf die Bindung von cFos an den Promotor. Weder nach TPA-Induktion noch nach Dexamethason-Stimulierung unterschied sich die Menge an

gebundenem cFos signifikant (Spur 2 und 3 verglichen mit Spur 11 und 12). Dagegen konnten in den Trip6-reduzierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nur noch 30% an nTrip6 auf dem Promotor nachgewiesen werden (Spur 2 und 3 verglichen mit Spur 11 und 12). Dies führte zu einer signifikanten Reduktion von GR auf dem Promotor der Trip6-reduzierten Zellen auf 20% (Vergleiche Spur 3 mit Spur 12).

Die Bindung der Proteine nTrip6, GR und cFos erfolgte spezifisch auf dem Promotor der KollagenaseI, da sowohl in der kodierenden Region als auch auf dem snRNA-Promotor keine Bindung nachgewiesen werden konnte (Spur 4-9 sowie 13-18).

Mit den Ergebnissen dieser funktionellen Studien kann eindeutig bewiesen werden, dass nTrip6 benötigt wird, um den GR zum Zweck der Repression an den Promotor von AP-1- und NF- κ B-regulierten Genen zu binden. Ohne nTrip6 kann der GR nicht am Promotor lokalisiert werden und es findet keine Repression statt.

3.5 Interaktion von Trip6 mit den Mitgliedern der AP-1- bzw. NF- κ B-Familien

Bisher wurde nur die Interaktion von Trip6 mit dem AP-1-Familienmitglied cFos sowie dem NF- κ B-Familienmitglied RelA/p65 behandelt. Beide Familien bestehen aber aus weitaus mehr Mitgliedern. Im nächsten Schritt soll untersucht werden, mit welchen Familienmitgliedern Trip6 interagiert und ob aus eventuellen Präferenzen dieser Bindung funktionelle Rückschlüsse auf die Funktion von Trip6 *in vivo* gezogen werden können.

3.5.1 Trip6 interagiert spezifisch mit Fos-Familienmitgliedern

Für den Interaktionstest wurde GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ an mit Agarose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit den potentiellen Partnerproteinen der Fos-Familie: cFos, Fra1, Fra2 und FosB gemischt. Diese wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin zuvor *in vitro* translatiert. Nach Inkubation erfolgte Präzipitation des an Agarose gebundenen Trip6-Fusionsproteins durch Zentrifugation. Fand eine Interaktion statt, so konnte das radioaktiv markierte Protein nach SDS-PAGE durch Autoradiographie in diesem Präzipitat detektiert werden.

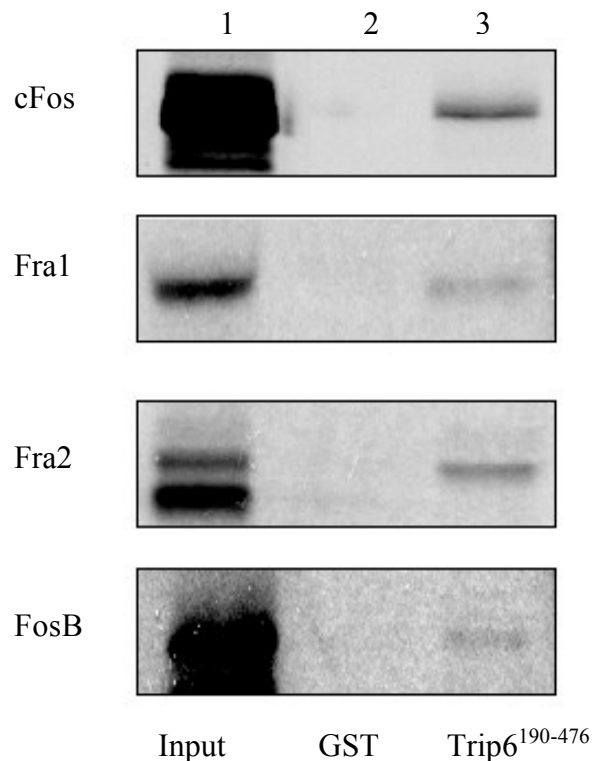


Abb.19: Trip6 interagiert mit allen Mitgliedern der Fos-Familie

cFos, Fra1, Fra2 und FosB wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert und durch an Glutathion-Agarose immobilisiertes GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein präzipitiert (Spur 3). Als Negativkontrolle wurde in Spur 2 (GST) Agarose-gekoppeltes GST-Protein verwendet. Der Input beschreibt die Ladekontrolle von 10% des *in vitro* translatierten Proteins.

Trip6 interagiert mit allen Mitgliedern der Fos-Familie (Spur 3). Diese Interaktion ist spezifisch, da kein Signal in Spur 2 (GST) zu sehen ist. Hier wurde als Kontrolle nur die Glutathion-S-Transferase eingesetzt.

3.5.2 Trip6 interagiert nicht mit Jun-Familienmitgliedern oder ATF2

Die Versuchsdurchführung verlief parallel zu der in Kapitel 3. 6. 1 beschriebenen. Es wurden hier die *in vitro* translatierten, ^{35}S -markierten Proteine cJun, JunB, JunD und ATF2 auf Interaktion mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ getestet.

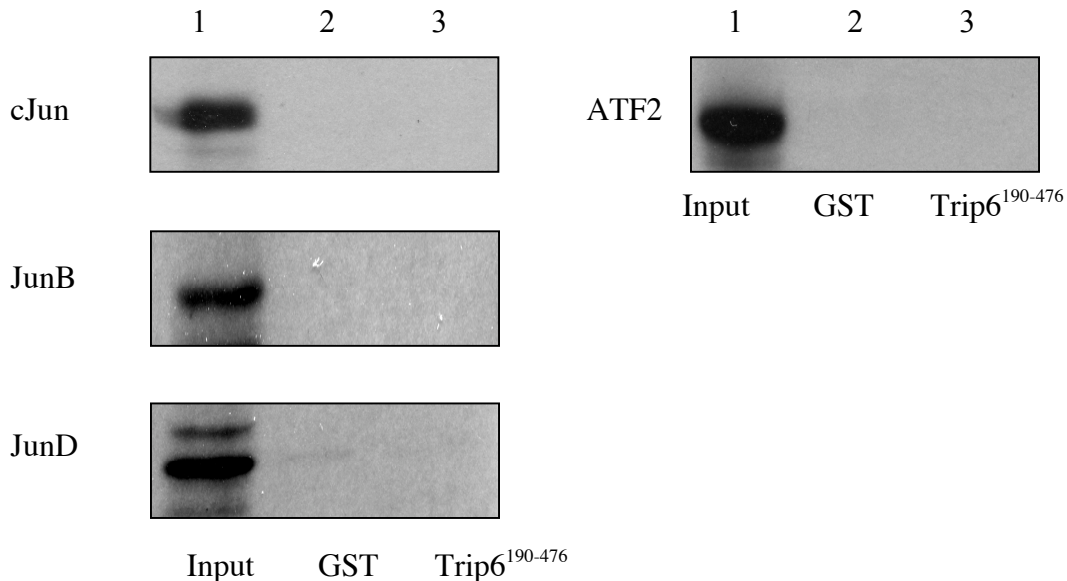


Abb.20: Trip6 interagiert nicht mit den Mitgliedern der Jun-Familie oder ATF2

cJun, JunD, JunB und ATF2 wurden in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin *in vitro* translatiert und auf Interaktion mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ getestet (Spur 3). Der Versuch wurde durchgeführt wie unter Abb.19 beschrieben.

Trip6 interagiert weder mit den Mitgliedern der Jun-Familie noch mit ATF2. Im gleichen Ansatz wurden die Interaktionstests mit Trip6 und der Fos-Familie durchgeführt (Abbildung 19). Diese können somit als Positivkontrolle gewertet werden.

Trip6 interagiert spezifisch mit allen Fos-Proteinen der AP-1 Familie, aber nicht mit den Jun-Proteinen oder ATF2. Es muss nun untersucht werden, welche Gene von Fos-enthaltenden AP-1-Dimeren reguliert werden, im Gegensatz zu reinen Jun-Dimeren oder Jun-ATF2-Dimeren. Damit könnten Rückschlüsse auf die Funktion von Trip6 gezogen werden. Interessant wäre auch zu sehen, ob z.B. nur Fos-enthaltende AP-1-Dimere von GR reprimiert werden können.

3.5.3 Trip6 interagiert spezifisch mit einigen Mitgliedern der NF-κB-Familie

Auch die NF-κB-Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus mehreren Mitgliedern, nicht nur aus RelA/p65. Die Familienmitglieder werden *in vitro* auf Interaktion mit Trip6 untersucht, um möglichst funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können.

Dieser Versuch wurde durchgeführt wie in 3. 6. 1 beschrieben. Es wurden dafür die *in vitro* translatierten, ³⁵S-markierten NF-κB-Familienmitglieder p50, p52, RelA/p65, RelB und cRel auf Interaktion mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ getestet.

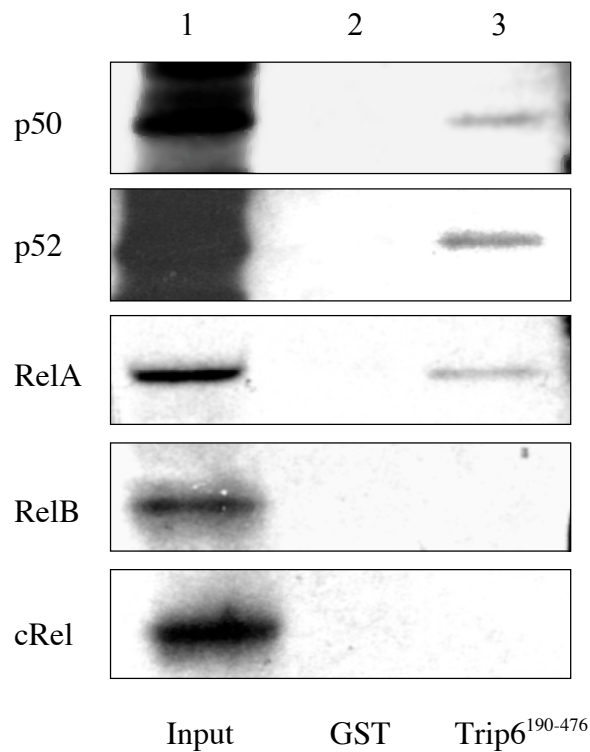


Abb.21: Trip6 interagiert mit Mitgliedern der NF-κB-Familie

p50, p52, RelA/p65, RelB und cRel wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert und auf Interaktion mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ getestet (Spur 3). Der Versuch wurde durchgeführt wie in Abb.19 beschrieben.

Trip6 interagiert spezifisch mit p50, p52 und RelA/p65 *in vitro*, jedoch nicht mit RelB und cRel. Diese Bindungen waren spezifisch, da kein Signal in der Kontrolle Spur 2 (GST) zu sehen ist.

Trip6 bindet spezifisch an p50, p52 und RelA/p65. Auch hier wäre es interessant, ob das Genprofil von NF- κ B-Dimeren, die aus diesen Proteinen aufgebaut sind, funktionelle Gemeinsamkeiten aufweist, da nur sie an Trip6 binden; oder ob nur diese Dimere durch GR reprimiert werden können. Damit könnten Rückschlüsse auf die Funktion von Trip6 *in vivo* getroffen werden.

3.6 Zusätzliche Faktoren sind nötig

nTrip6 wird zur Repression benötigt. Die Funktion dieses Proteins besteht darin, als molekulare Plattform den GR in unmittelbare Nähe zur Promotorregion von Zielgenen zu binden, damit der GR als Transrepressor wirken kann. Die Frage ist nun, ob nTrip6 und der GR ausreichen, um beliebige Zielgene zu reprimieren.

3.6.1 GR und Trip6 reichen zur Repression nicht aus

Die Frage, ob nTrip6 und der GR ausreichen, um beliebige Zielgene zu reprimieren, lässt sich mit Hilfe von Gal4DBD-Fusionsproteinen und deren Effekt auf ein Gal4-abhängiges Reportergen untersuchen. Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ wurde hierzu an die DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 fusioniert und der Effekt des Fusionsproteins auf ein Gal4-Luziferase-Reportergen analysiert. Anschließend wurde untersucht, ob sich dieser Effekt durch Aktivierung von kotransfiziertem GR verändert. Es wurden Cos7-Zellen verwendet, die selbst keinen endogenen GR exprimieren.

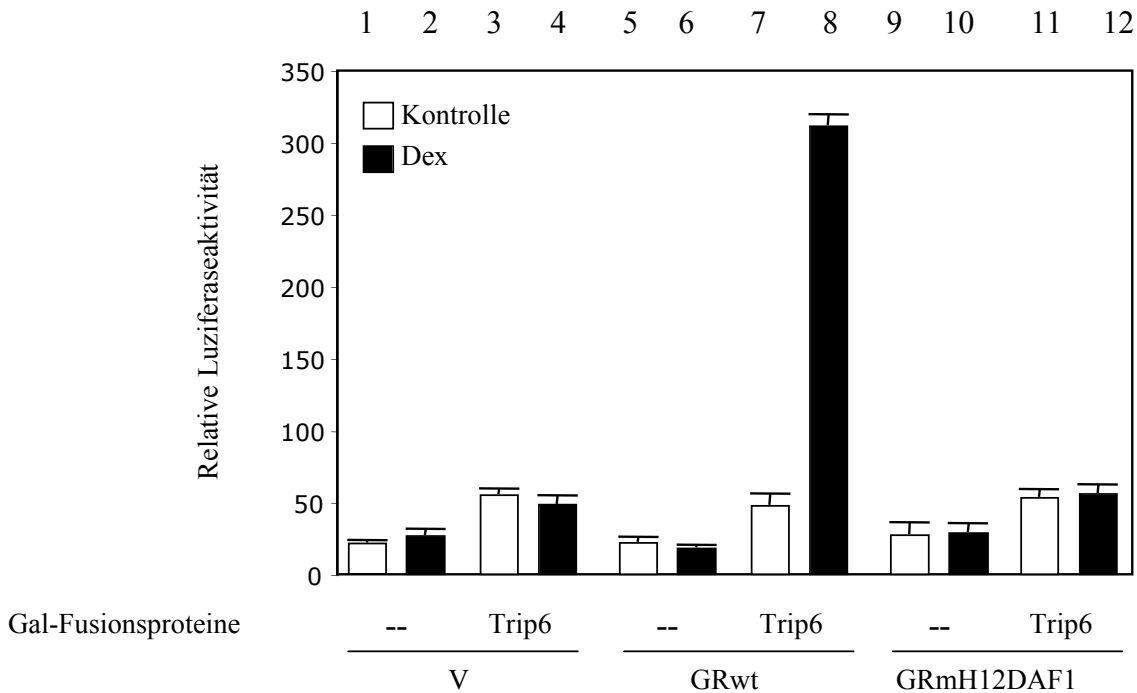


Abb.22: Effekt von GR und DBD-Trip6 auf einen Gal4-Luziferasereporter

Pro Ansatz wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene 5×10^5 logarithmisch wachsende Cos7-Zellen mit jeweils 100ng eines Gal4-Luziferasereporters sowie mit 0,5-1 μ g eines GAL-DBD-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Expressionsvektors transfiziert. Kotransfektion erfolgte mit 0,5-1 μ g eines Expressionsvektors für den Glukokortikoid-Rezeptor (GRwt) bzw. die GR-Mutante GRmH12 Δ AF1. Nach 24 h wurden die Zellen für 16 h mit 10^{-7} M Dexamethason behandelt (schwarz) oder nicht behandelt (weiß). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (--) und dem Reporterkonstrukt transfiziert. Die relative Luziferaseaktivität ergibt sich aus dem Verhältnis der in Abwesenheit und Anwesenheit von Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bzw. GR +/- Dexamethason gemessenen Luziferaseaktivität. Alle Luziferaseaktivitäten wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte 16 Stunden nach der Induktion mit Dexamethason. Die dargestellten Messwerte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten und direkt proportional zur Photinus-Luziferase-Menge. Sie veranschaulichen somit die Aktivität des MMTV-Promotors.

Nach Transfektion des Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-DBD-Fusionsproteins steigerte sich die transkriptionelle Aktivität des Reportergens auf mehr als das Doppelte (Balken 1 verglichen mit Balken 3). Dexamethason (2 und 4) führte zu keiner Veränderung, da Cos7-Zellen keinen endogenen GR exprimieren, der auf Dexamethason reagieren könnte.

Im nächsten Versuchsansatz erfolgte nach Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Transfektion erneut eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität um mehr als das Doppelte; Kotransfektion von GR führte zu einem rapiden Anstieg auf das mehr als 30fache. Kotransfektion der GR-Mutante GRmH12ΔAF1 zeigte diesen Effekt nicht. Diese Mutante ist nicht mehr zur Transaktivierung befähigt, nur noch zur Transrepression.

In einem unabhängigen GAL-System wirkt Trip6 als Koaktivator. Diese Aktivität kann aber nicht durch den GR reprimiert werden. Im Gegenteil, der GR wirkt hierbei als Koaktivator und erwirkt eine Superaktivierung. Dies ist zurückzuführen auf die Aktivierungs-Kapazität des GR. Die Mutante GRmH12ΔAF1, die diese Aktivierungs-Kapazität verloren hat, aber noch reprimieren kann, zeigt diese Superaktivierung nicht. Auch diese Mutante zeigt keine Repression der transkriptionellen Aktivität.

Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, dass Trip6 und GR allein keine Repression vermitteln können. Dies kann darin begründet sein, dass zusätzliche Promotor-spezifische Faktoren zur Repression benötigt werden.

Ergebnisse

Kapitel II: Die Rolle von Trip6 bei der Repression des GR durch AP-1

Der GR ist in der Lage, nach Aktivierung durch Glukokortikoide, über sogenannte GREs (*glucocorticoid responsive elements*) direkt an DNA zu binden und spezifische Zielgene zu aktivieren. Diese Funktion wird als Transaktivierung bezeichnet.

3.7 Der Effekt von Trip6 auf die Transaktivierungsfunktion des GR

Bisher wurde der Zusammenhang von Trip6 und der Transrepressionsfunktion des GR untersucht. Nun soll untersucht werden, ob Trip6 auch einen Einfluss auf die Transaktivierungsfunktion des GR hat. Vielleicht ist der funktionelle Unterschied dieser beiden Funktionen in der Interaktion mit Trip6 zu finden.

3.7.1 Trip6 ist ein Koaktivator des GR

Die Transaktivierung von Genen durch den GR kann in Zellkultur durch die Verwendung eines geeigneten Reporter-genplasmids analysiert werden. Dieses Luziferasereporter-gen enthält einen Teil des MMTV-Promotors (*Maus Mamma Tumor Virus*), der klassische GREs trägt und durch GR-Homodimere aktiviert wird. Nach Dexamethason-Behandlung in GR-exprimierenden Zellen lässt sich gesteigerte Reporter-genaktivität messen. Zur Analyse des Einflusses von Trip6 auf die Transaktivierung wurde das MMTV-Reporter-genplasmid zusammen mit einem Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Expressionsvektor in HeLa-Zellen transfiziert.

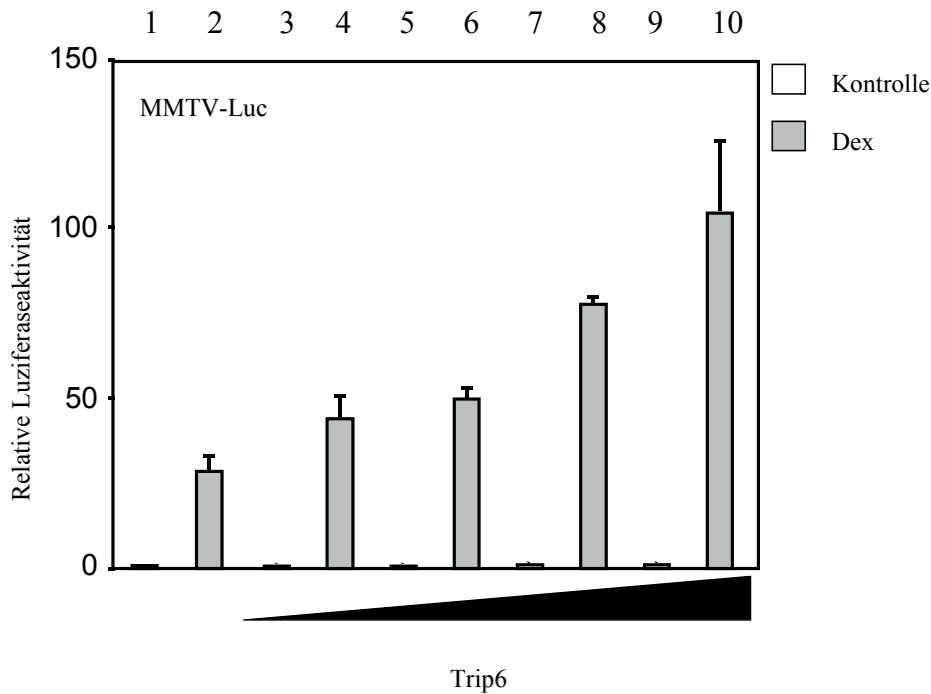


Abb.23: Einfluss von Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ auf die Transaktivierungsfunktion des GR

5x10⁵ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofektamin mit jeweils 120 ng eines MMTV-Luziferasereporters sowie 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1 µg Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Expressionsvektor (pcDNA198) und entsprechenden Mengen (bis zu einer Gesamtmenge von jeweils 1 µg) Leervektor (pcDNA3.1+) kotransfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde jede Probe zusätzlich mit 120 ng eines Renilla-Luziferase-Expressionsvektors (Ubi-Renilla) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (graue Balken) im Vergleich zu uninduzierten Zellen (weiße Balken). Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität. Die dargestellten Messwerte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten und direkt proportional zur *Photinus*-Luziferase-Menge. Sie veranschaulichen somit die Aktivität des MMTV-Promotors und wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert.

Behandlung von HeLa-Zellen mit Dexamethason führte zur Aktivierung des Reportergens durch hormonegebundenen GR auf das 30fache im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Balken 1 und 2). Diese Aktivität konnte durch Kotransfektion von 0,05 µg Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ auf das 45 fache gesteigert werden (Balken 4). Kotransfektion von steigenden Mengen an Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bis zu 1 µg führten proportional zu einer höheren Reportergenaktivität. Ohne den hormonaktivierten GR sind

selbst große Mengen transfiziertes Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ nicht in der Lage das MMTV-Reportergen zu aktivieren (weiße Balken).

Damit konnte gezeigt werden, dass Trip6 selbst kein klassischer Transkriptionsfaktor ist, das Protein kann nur den GR in seiner transkriptionellen Aktivität verstärken. Damit hat Trip6 die Funktion eines Koaktivators des GR oder Trip6 vermittelt die Bindung an Koaktivatoren.

3.7.2 GR-Transaktivierung kann durch cFos reprimiert werden

In der Literatur (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990) ist beschrieben, dass die GR-Transaktivierung durch AP-1 reprimiert werden kann. Dieser Prozess ist die Umkehrung der AP-1-Aktivierung, die durch den GR reprimiert werden kann und wird deshalb als *reverse crosstalk* bezeichnet. Dies soll mit Hilfe des MMTV-Luziferase-Reporters untersucht werden. HeLa-Zellen werden mit Dexamethason aktiviert und der Effekt von steigenden Mengen an kotransfiziertem cFos auf die Reportergenaktivität gemessen.

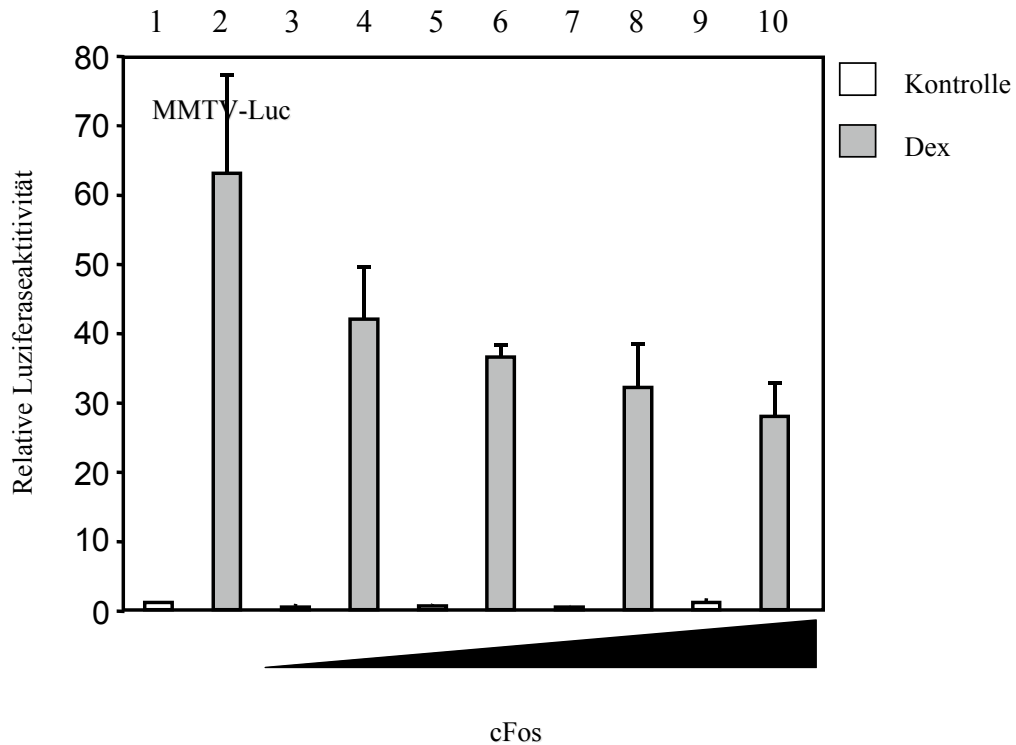


Abb.24: Der Einfluss von steigenden Mengen cFos auf die Aktivität des MMTV-Promotors
 5×10^5 logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofektamin mit jeweils 120 ng eines MMTV-Luziferasereporters und 0; 0,1; 0,3; 0,5 bzw. 1 μg eines cFos-Expressionsvektors sowie entsprechenden Mengen Leervektor (pcDNA3.1+; bis zu einer Gesamt-DNA-Menge von 1 μg) kotransfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte zusätzliche Transfektion mit 120 ng eines Renilla-Luziferase-Expressionsvektors (Ubi-Renilla) zu jeder Probe. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (graue Balken), im Vergleich zu uninduzierten Zellen (weiße Balken). Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität. Die dargestellten Messwerte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten und direkt proportional zur *Photinus*-Luziferase-Menge. Sie veranschaulichen somit die Aktivität des MMTV-Promotors und wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert.

Behandlung von HeLa-Zellen mit Dexamethason führte zur Aktivierung des Reportergens durch hormonegebundenen GR (Vergleich Balken 1 mit Balken 2). Diese Aktivität konnte durch Kotransfektion von 0,1 μg cFos bereits auf ca. 2/3 reduziert werden (Vergleich Balken 4 mit Balken 2). Erhöhung der Menge an transfiziertem cFos auf bis zu 1 μg führte proportional zur Reduktion der transkriptionellen Aktivität auf ca. 50% (Balken 10).

Die GR-Transaktivierung kann durch AP-1 reprimiert werden. Im Folgenden soll untersucht werden, ob auch diese Repression durch Trip6 vermittelt wird.

3.7.3 Trip6 mit mutierter Domäne Lim 1 zerstört die Repressionswirkung von cFos auf GR-Transaktivierung

Trip6 vermittelt Koaktivator-ähnliche Funktion bei der GR-Transaktivierung und diese Transaktivierung kann durch cFos reprimiert werden. Welche Rolle spielt Trip6 in dieser Transrepression? Um dies zu untersuchen, wurde die Mutante Trip6-198Lim1m eingesetzt. Diese Mutante kann nicht mehr an cFos binden, wie in 3. 2. 3 bewiesen wurde. Falls auch die Repression der GR-Transaktivierung durch cFos über Trip6 vermittelt wird, sollte diese Mutante einen Einfluss auf die Transrepression zeigen. Auch dies wird mit Hilfe des MMTV-Luziferase-Reporters untersucht. HeLa-Zellen werden mit Dexamethason aktiviert und mit transfiziertem cFos reprimiert. Dazu wird der Effekt von kotransfiziertem Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ bzw. der Mutante Trip6-198Lim1m untersucht.

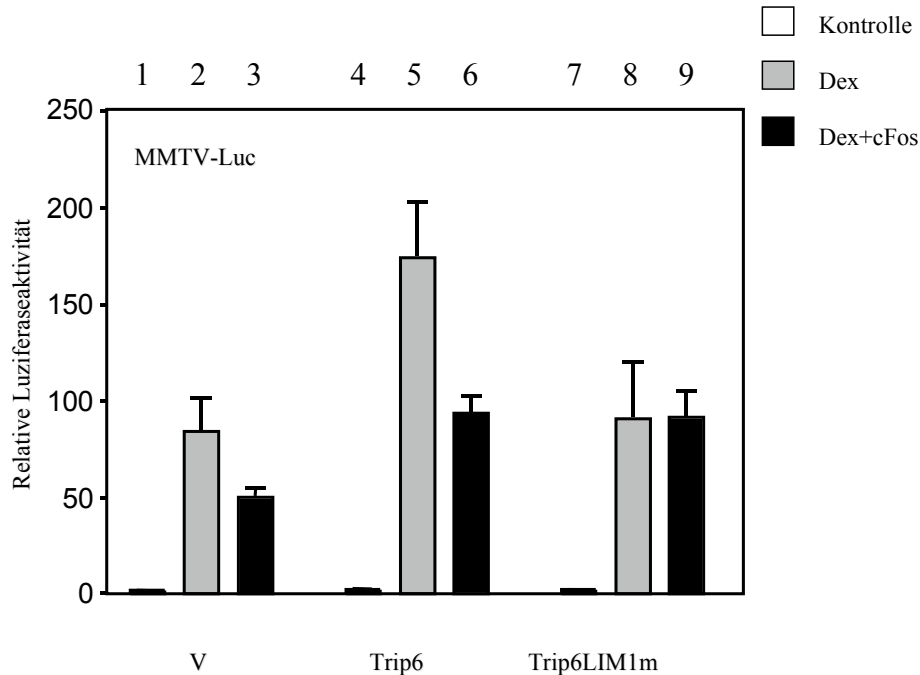


Abb.25: Der Einfluss der Mutante Trip6Lim1m auf die Aktivität des MMTV-Promotors

5×10^5 logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden durch Lipofektamin mit jeweils 120 ng eines MMTV-Luziferasereporters und 0,3 μg eines Trip6- (pcDNA¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶) bzw. Trip6Lim1m-Expressionsvektors (pcDNATrip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1) transfiziert. Bei einem Drittel der Ansätze erfolgte eine Kotransfektion mit 0,3 μg eines cFos-Expressionsvektors (schwarze Balken). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte zusätzliche Transfektion mit 120 ng eines Renilla-Luziferase-Expressionsvektors (Ubi-Renilla) zu jeder Probe. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Dexamethason behandelt (graue und schwarze Balken) im Vergleich zu uninduzierten Zellen (weiße Balken). Nach weiteren 12 Stunden erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität. Die dargestellten Messwerte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten und direkt proportional zur *Photinus*-Luziferase-Menge. Sie veranschaulichen somit die Aktivität des MMTV-Promotors und wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert.

Das Ergebnis der ersten Säulen 1-3 entspricht dem Versuch 3.7.3. Die Aktivität des MMTV-Reportergens konnte durch Dexamethason-aktivierten GR induziert werden (Säule 2). Die Kotransfektion von cFos reprimierte diese Aktivität auf ca. 60% (Säule 3). Die nächsten drei Säulen (Trip6) entsprechen dem Versuch 3.7.1. Trip6 verstärkte als Koaktivator die transkriptionelle Aktivität des GR (Vergleich Säule 5 mit Säule 2). Auch dieser Vorgang konnte durch Kotransfektion von cFos auf ca. 60% reprimiert werden (Säule 6). Dagegen war die Trip6-

Mutante Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶Lim1m nicht zur Koaktivierung in der Lage. In Anwesenheit dieser Mutante fand keine Repression durch cFos mehr statt (Säule 9 verglichen mit Säule 8).

Die Mutante Trip6198Lim1m ist nicht mehr in der Lage mit cFos zu interagieren. Dieser Defekt zerstört die Repression der GR-Transaktivierung durch cFos. Das bedeutet, dass Trip6, speziell die Lim-Domäne Lim 1, benötigt wird, damit cFos reprimieren kann. Auch für diese Repressionsfunktion ist Trip6 unerlässlich.

Überraschenderweise kann Trip6 mit mutierter Lim 1 nicht mehr als Koaktivator für den GR wirken (Vergleich Säule 8 mit Säule 5). Die Bindung zwischen GR und Trip6 wird aber über die Lim 3 vermittelt, Trip6 ist also am Promotor lokalisiert. Das bedeutet, auch die Koaktivatorfunktion dieses Proteins liegt in der Lim-Domäne Lim 1 oder wird von dessen Struktur beeinflusst.

3.7.4 Trip6 mit mutierter Domäne Lim 3 beeinflusst nicht die Repressionswirkung von cFos auf GR-Transaktivierung

In diesem Versuch wurde die Mutante Trip6-Lim3m eingesetzt. Diese Mutante kann nicht mehr an den GR binden, wie in 3. 2. 3 bewiesen wurde. Der Effekt dieser Mutante auf die GR-Transaktivierung soll untersucht werden im Vergleich zum intakten Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶. Die Versuchsbedingungen entsprechen den in Kapitel 3. 7. 3 beschriebenen.

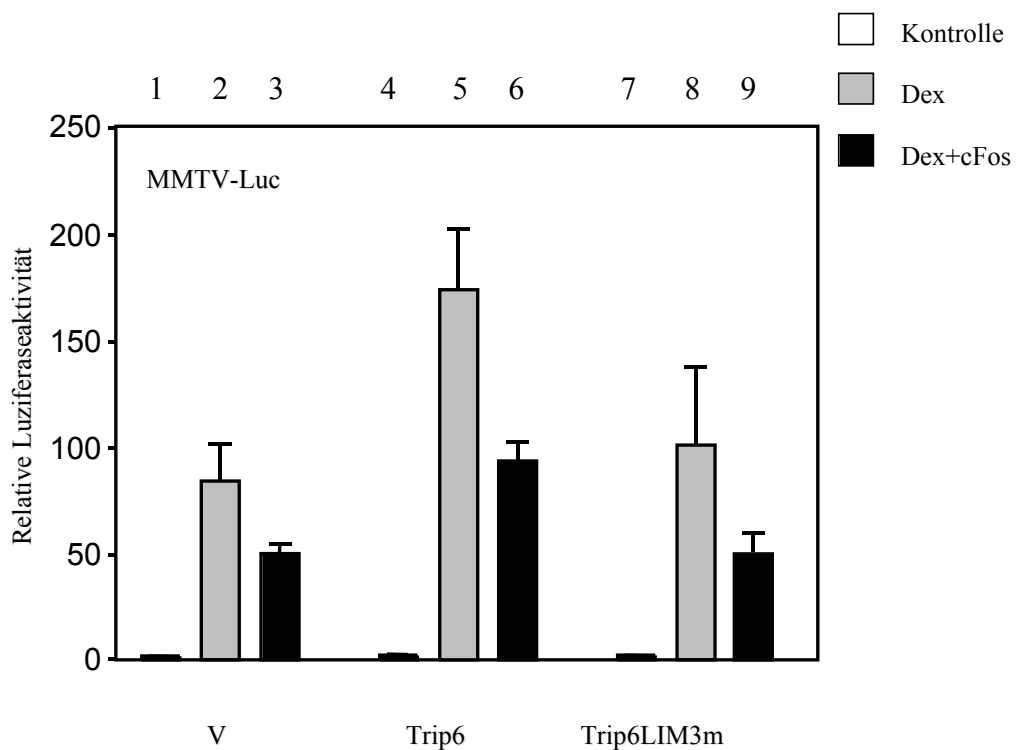


Abb.26: Der Einfluss der Mutante Trip6Lim3m auf die Aktivität des MMTV-Promotors

5×10^5 logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden durch Lipofektamin mit jeweils 120 ng eines MMTV-Luziferasereporters und $0,3 \mu\text{g}$ eines Trip6- (pcDNA198) bzw. Trip6Lim3m-Expressionsvektors (pcDNATrip6Lim3) transfiziert. Der Versuch erfolgte wie unter Abb.25 beschrieben. Die dargestellten Messwerte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten und direkt proportional zur *Photinus*-Luziferase-Menge. Sie veranschaulichen die Aktivität des MMTV-Promotors.

Auch hier war zu sehen, dass die Aktivität des MMTV-Reportergens durch Dexamethason-aktivierten GR induziert werden kann und Kotransfektion von cFos diese Aktivität auf ca. 60%

reduzierte (Säulen 1-3). Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ konnte als Koaktivator die transkriptionelle Aktivität des GR verstärken (Vergleich Säule 5 mit Säule 2). Auch dieser Vorgang konnte durch Kotransfektion von cFos auf ca. 60% reprimiert werden (Säule 6).

Die Trip6-Mutante Trip6Lim3m war nicht zur Koaktivierung des Reporter gens in der Lage (Säule 8), die GR-Transaktivierung konnte aber auch in Anwesenheit dieser Mutante durch cFos auf ca. 50% reprimiert werden (Säule 9).

Trip6 ohne funktionelle Lim-Domäne Lim 3 kann nicht mehr mit dem GR interagieren. Dieser Defekt verhindert die Koaktivierungsfunktion von Trip6 bei der GR-Transaktivierung. Das bedeutet, ein direkter Kontakt zwischen dem GR und Trip6, genauer der Trip6 Lim-Domäne Lim 3, wird dazu benötigt. Da diese Trip6-Mutante nicht mehr an den GR binden kann, also nicht am Promotor lokalisiert ist, verläuft die durch cFos vermittelte Repression wahrscheinlich ungestört durch endogenes intaktes Trip6.

Trip6 wird sowohl zur Transaktivierung des GR als auch zur AP-1-vermittelten Repression dieser Aktivierung benötigt; einerseits als Koaktivator für die Transaktivierung, andererseits, um cFos vermittelte Repression zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt soll untersucht werden, ob diese Proteine im Komplex auf dem Promotor eines GR-aktivierten Gens zu finden sind.

3.8 Promotorstudien der GR-Transaktivierung

Bindungsstudien zeigten, dass Trip6 *in vitro* über die Lim-Domäne Lim 3 an den GR binden kann und diese Bindung funktionell in die Transaktivierungsfunktion des GR involviert ist. Außerdem bindet Trip6 spezifisch über seine Lim-Domäne Lim 1 an cFos und diese Interaktion ist zur Repression der GR-Transaktivierung durch AP-1 unerlässlich. Nun soll mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation die Promotorbesetzung bei der Transaktivierung sowie Repression des GR-aktivierten Zielgens Tyrosinaminotransferase (TAT) untersucht werden.

Dazu wurden FTO-Zellen unbehandelt verwendet bzw. mit Dexamethason induziert, um den Transkriptionsfaktor GR zu aktivieren und an sein spezifisches Promotorelement (GRE) zu binden. Parallel dazu wurden Dexamethason-induzierte FTO-Zellen mit dem Phorbolster TPA behandelt, um AP-1 zu aktivieren und den aktivierten GR zu reprimieren. Nach Induktion erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Formaldehyd (*Crosslinking*), die Zellen wurden geerntet, die DNA, an der die Transkriptionsfaktoren nun fest gebunden waren, wurde durch Ultraschalleinwirkung geschert und cFos-, nTrip6- und GR-enhaltende Chromatin-Fragmente wurden mit spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Nach Lösen der Interaktionen (*Decrosslinking*) und Verdau der Proteine wurde über PCR die GRE-enhaltende Promotorsequenz des TAT-Zielgens amplifiziert. Erfolgte eine Amplifikation, so ist der immunopräzipitierte Transkriptionsfaktor auf dem Promotor lokalisiert. Es wurden die gleichen Kontrollen verwendet wie bereits in Kapitel 3. 3. beschrieben.

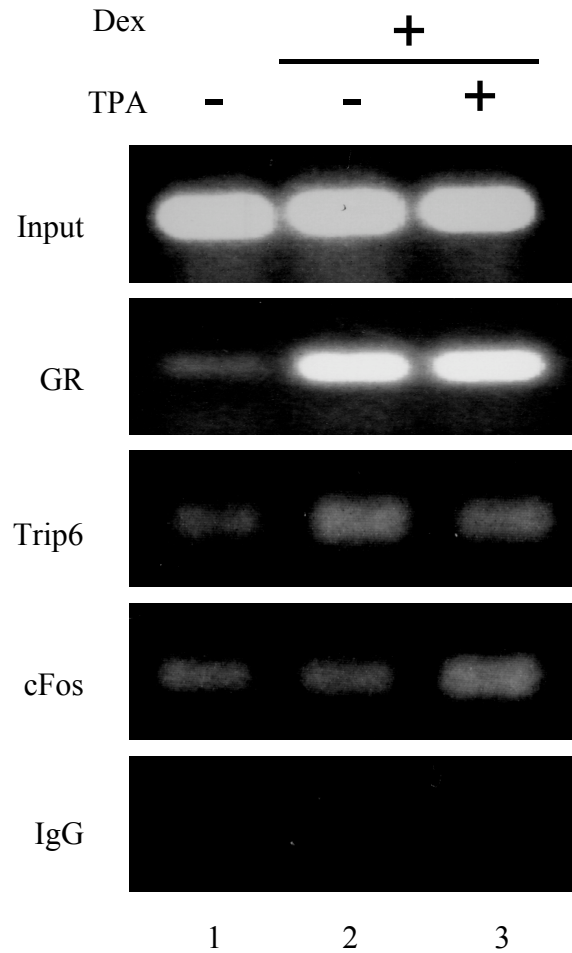


Abb.27: Promotorbesetzung des GR-regulierten Tyrosin-Aminotransferase-Gens (TAT)

Chromatin-Immunopräzipitation wurde mit unbehandelten, Dexamethason (Dex)-behandelten sowie TPA-induzierten FTO-Zellen durchgeführt. Über PCR wurde die Lokalisation der Proteine GR, cFos und nTrip6 auf dem Promotor des TAT-Gens amplifiziert. Dies geschah nach Immunopräzipitation dieser Proteine mit spezifischen Antikörpern. Als Negativkontrolle wurde ein Isotyp-Antikörper (IgG) verwendet. Außerdem erfolgte Amplifikation der Promotorsequenz des Gens snRNA, das nicht von cFos, GR oder nTrip6 reguliert wird. In Spur 1 ist jeweils die Promotor-Besetzung nicht induzierter Zellen zu sehen, in Spur 2 Dex-induzierter Zellen und in Spur 3 Dexamethason-induzierter Zellen, die zusätzlich TPA-behandelt wurden.

Alle Transkriptionsfaktoren waren bereits in unstimulierten Zellen am Promotor lokalisiert. Dies ist auf ein Problem bei der Vorbehandlung der Zellen zurückzuführen. Die FTO-Zellen konnten nicht gehungert werden wie in den bisher beschriebenen Chromatin-IP-Experimenten. Sie mussten

stets in Serum-haltigem Medium kultiviert werden, um ein Überleben zu gewährleisten. Dies führte zur ständigen basalen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren.

Die Aktivierung mit Dexamethason führte jedoch zu einer deutlichen Zunahme der GR- und nTrip6-Menge am Promotor (Spalte2). TPA-Behandlung bewirkte einen deutlichen Anstieg von gebundenem cFos. Auch nTrip6 und der GR waren nach TPA-Behandlung noch am Promotor gebunden. Die Bindung dieser Proteine war spezifisch für den TAT-Promotor; keines der Proteine konnte auf dem Promotor des snRNA-Gens lokalisiert werden. Die Antikörper binden spezifisch an ihr jeweiliges Protein, die IgG-Negativkontrolle zeigt keinerlei Signal.

Der GR transloziert verstärkt nach Aktivierung mit Dexamethason an den Promotor und bleibt auch unter reprimierten Bedingungen gebunden. Die Repression beruht also nicht auf dem Verdrängen des gebundenen Transkriptionsfaktors GR. nTrip6 ist bei der transkriptionellen Aktivierung des Tyrosinaminotransferase-Gens und ebenso in der Repression dieses Gens am Promotor lokalisiert.

nTrip6 ist bei der Aktivierung sowie der Repression der Aktivität von GR-regulierten Zielgenen an den Promotor gebunden.

Kapitel III: Interaktionsstudien des GR mit Trip6

nTrip6 wird zur Transaktivierungs- und Transrepressionsfunktion des GR benötigt. Ohne nTrip6 kann keine Transrepression stattfinden. Um den Vorgang der Transrepression genauer zu untersuchen, wäre eine GR-Mutante von Nutzen, die zur Repression nicht in der Lage ist. Eine GR-Mutante, die nicht mehr an Trip6 bindet, sollte diese Eigenschaft erfüllen. Zu diesem Zweck soll die genaue Proteinstruktur des GR bestimmt werden, die für die Interaktion mit Trip6 zuständig ist.

3.9 Der GR interagiert mit Trip6 über den N-terminalen Bereich seiner DBD

Zur ersten Näherung, welche Domäne des GR mit Trip6 interagiert, wurden GR-Deletionsmutanten hergestellt, denen jeweils eine funktionelle Domäne fehlt. Diese Mutanten wurden auf ihre Interaktionsfähigkeit mit Trip6 untersucht, indem ein GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein an mit Agarose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit den GR-Deletionsmutanten inkubiert wurde. Diese GR-Mutanten wurden zuvor in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert. Nach Inkubation erfolgte Präzipitation der an Agarose gebundenen Trip6-Konstrukte durch Zentrifugation. Fand eine Interaktion statt, so konnte das radioaktiv markierte Protein in diesem Präzipitat detektiert werden. Der Nachweis erfolgte nach einer SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durch Autoradiographie.

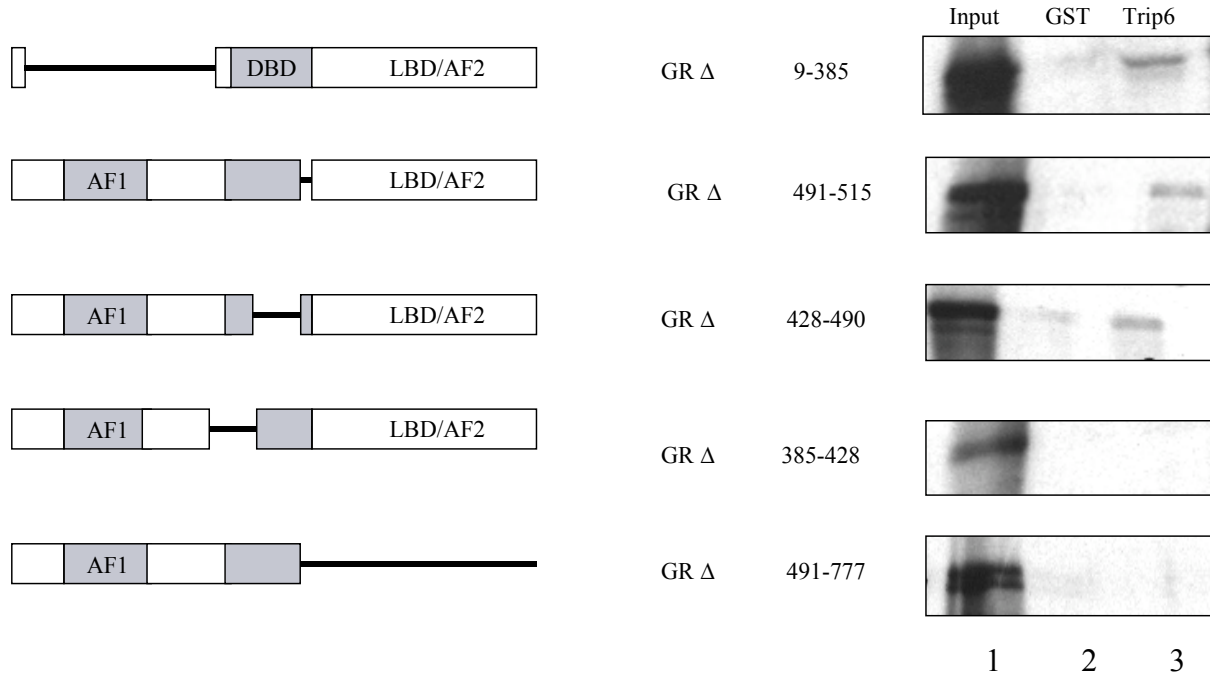


Abb.28: Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Interaktionstest mit GR-Deletionsmutanten

GR-Deletionsmutanten wurden in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem Methionin *in vitro* translatiert und durch an Glutathion-Agarose immobilisiertes GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein präzipitiert. In den schematischen Darstellungen auf der linken Seite sind die fehlenden Domänen jeder Deletionsmutante als schwarze Linien dargestellt. Die als Δ beschriebenen Zahlen bezeichnen die jeweils fehlenden Aminosäuren des Glukokortikoid-Rezeptors. Als Negativkontrolle wurde in Spur 2 (GST) das an Agarose gekoppelte GST-Protein verwendet. In Spur 1 wurden 10% der jeweiligen *in vitro* translatierten GR-Mutante aufgetragen (Input), im Vergleich zur Proteinmenge, die in den einzelnen Interaktionsstudien verwendet wurde. Spur 3 zeigt die Interaktion von Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ mit den jeweiligen GR-Konstrukten.

Deletion der AF1 sowie der C-terminalen und zentralen Domäne der DBD hatten keinerlei Einfluss auf die Bindung an Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶. Diese Deletionsmutanten interagierten mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ *in vitro*. Deletion des N-terminalen Bereichs der DBD zerstörte die Bindung an Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶, ebenso die Deletion der kompletten AF2.

Die Bindung des GR an Trip6 wird durch zwei Domänen auf dem GR vermittelt, einmal durch den N-terminalen Bereich der DBD und zusätzlich über die LBD. Aus unveröffentlichten Daten (Wade, Heck) geht hervor, dass der N-terminale Bereich der DBD zur Transrepressions-Wirkung des GR benötigt wird. Im Folgenden wird der betreffende Bereich der DBD zwischen AS 385-428 genauer auf Interaktion mit Trip6 untersucht und die LBD/AF2-Domäne vorerst vernachlässigt.

3.10 Der GR interagiert mit Trip6 über einen Bereich zwischen AS 406-420

Um den Bereich der Interaktion zwischen Trip6 und dem GR genauer zu bestimmen, wird die sogenannte SPOT-Technologie genutzt. In diesem Verfahren wird ein Polypeptid aus 15 Aminosäuren synthetisch produziert und auf eine Membran *gespottet*. Das erste hier verwendete Peptid beginnt mit den ersten 15 Aminosäuren der Sequenz der N-terminalen DBD-Deletionsmutante, dies entspricht AS 385-400 des Wildtyp GR. Das zweite Peptid wird daneben *gespottet* und umfasst die Aminosäuren 388-403, also die Sequenz des ersten Peptids um drei Aminosäuren in Richtung C-Terminus verschoben. Auf diese Weise wird der ganze Bereich zwischen AS 385-428 in jeweils 15 Aminosäuren lange Peptide aufgeteilt und auf die Membran *gespottet*. Die Peptide auf dieser Membran sind frei zugänglich und werden mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ inkubiert. Bindet GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ an ein Peptid, so kann diese Bindung über einen spezifischen GST-Antikörper detektiert werden. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 29.

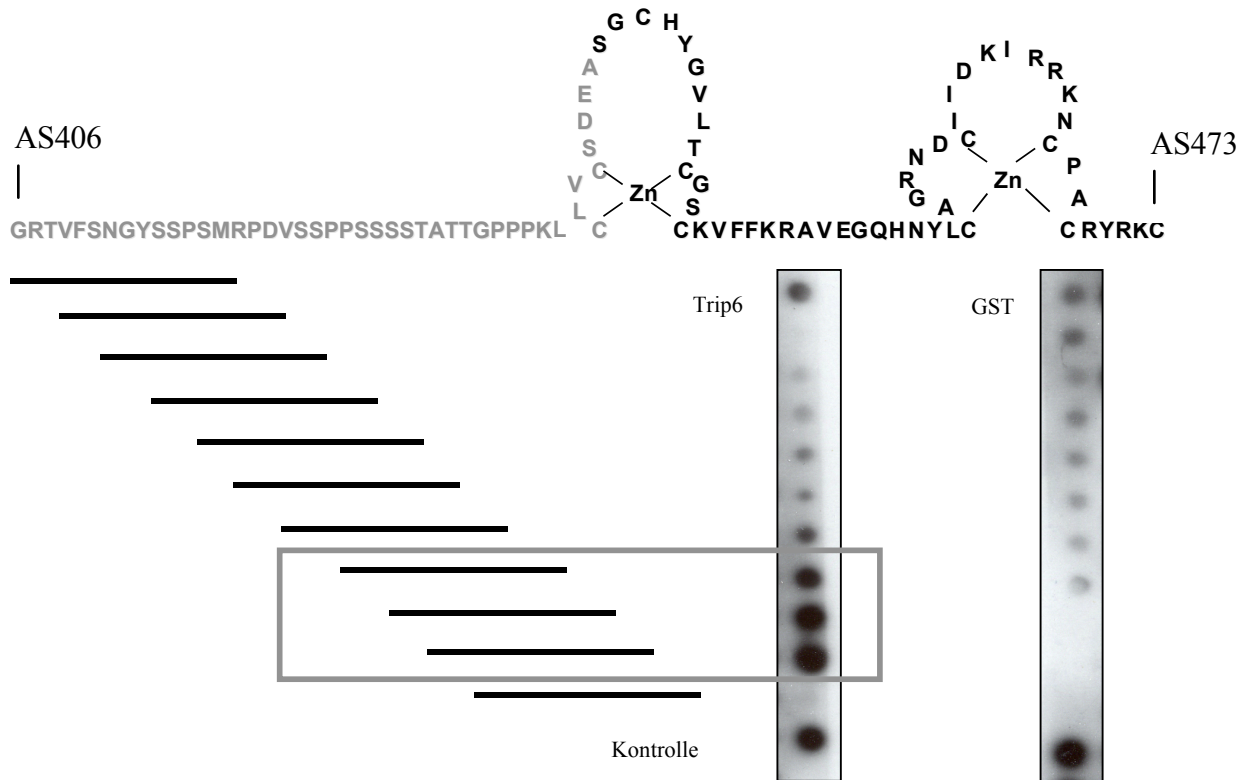


Abb.29: Der GR interagiert über seine Aminosäuren 406-420 mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶

Mit Hilfe der *Spot*TM-Technologie wurden die Aminosäuren 385-428 des Glukokortikoid-Rezeptors in Peptiden von jeweils 15 Aminosäuren auf eine Zellulose-Membran *gespottet*. Dies entspricht der grau dargestellten Sequenz vor dem Zinkfinger der DNA-Bindedomäne des GR. Die Sequenz jedes Spots unterscheidet sich vom benachbarten Spot um drei Aminosäuren, d.h. der Spot an Position 1 (ganz oben) umfasst die Aminosäuren 385-399, der Spot an Position 2 direkt darunter umfasst die Aminosäuren 388-402. Dies wurde fortgeführt, bis der gesamte Bereich von AS 385-428 abgedeckt war. Abschließend wurde als Positivkontrolle ein Epitop der Glutathion-S-Transferase aufgetragen (Kontrolle). Diese Membran wurde auf Interaktion mit einem GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein getestet (Trip6). Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper. Als Kontrolle, dass die Interaktion nicht unspezifisch über das GST-Protein des Fusionsproteins stattfand, diente eine zweite Zellulosemembran mit *Spots* derselben Peptide. Diese wurde auf Interaktion mit GST getestet (GST). Auch hier erfolgte der Nachweis mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper.

Die Peptide 8, 9 und 10 interagierten mit GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶. Diese Peptide binden spezifisch an Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶, da die GST-Kontrolle keine Bindung zeigt.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Interaktion zwischen GR und Trip6 über die Aminosäuren 406-420 des GR vermittelt wird.

3.11 Das Lysin an Position AS 419 des GR wird benötigt zur Interaktion des GR mit Trip6

Die Interaktionsoberfläche auf dem GR, die sich laut Versuch 3. 9. 2 zwischen Position 406-420 befindet, soll mit einem sogenannten Alanin-Scan genauer bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird das Peptid, welches die Aminosäuren 406-420 umfasst, auf eine Membran *gespottet*. Das nächste Peptid, das verwendet wird, umfasst die gleichen Aminosäuren, ersetzt aber die erste Aminosäure Prolin an Position 406 durch Alanin. Anschließend wird ein Peptid *gespottet*, dessen zweite Aminosäure Serin, Position 407, gegen Alanin ausgetauscht wurde. So wird weiter verfahren, bis jede Position dieses Peptids einmal gegen Alanin ersetzt wurde. Das ist schematisch in Abbildung 30 dargestellt.

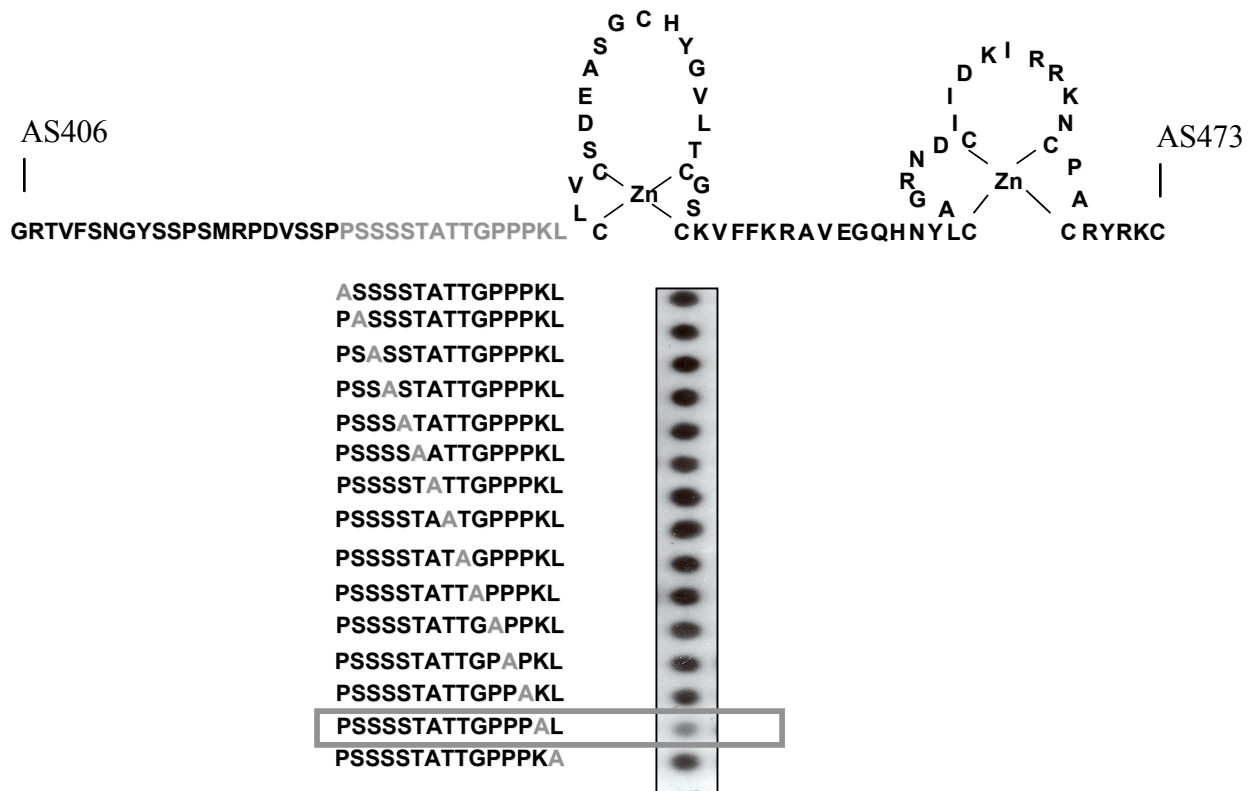


Abb.30: Der GR benötigt das Lysin an Position 419 zur Interaktion mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶

Mit Hilfe der SpotTM-Technologie wurden die Aminosäuren 406-420 des Glukokortikoid-Rezeptors auf eine Zellulose-Membran gespottet. Dies entspricht der grau dargestellten Sequenz vor dem Zinkfinger der DNA-Bindedomäne des GR. Die Sequenz jedes Spots unterscheidet sich vom benachbarten Spot dadurch, dass jeweils eine Aminosäure nach der anderen gegen Alanin ersetzt wurde. D.h. der Spot an Position 1 (ganz oben) besitzt an Position 406 statt Prolin ein Alanin. Der Spot an Position 2 direkt darunter besitzt an Position 407 statt Serin ein Alanin. Dies wurde fortgeführt, bis jede Aminosäure im Bereich von AS 406-420 des GR einmal durch Alanin ersetzt wurde. Anschließend wurde die Membran auf Interaktion mit einem GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein getestet. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper.

Austausch einzelner Aminosäuren gegen Alanin in der Sequenz 406-420 des Glukokortikoidrezeptors berührten nicht die Interaktion mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶, außer wenn das Lysin an Position 419 durch Alanin ersetzt wurde (grauer Kasten).

Zur Interaktion von Trip6 mit dem GR wird die Aminosäure Lysin an Position 419 benötigt. Bei genauer Betrachtung von Abbildung 29 fällt auf, dass auch Peptide, die dieses Lysin in der Sequenz aufweisen, nicht mit Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ interagieren. Das bedeutet, das Lysin allein reicht zur

Interaktion nicht aus. Ohne das Lysin findet aber in keinem Fall eine Bindung statt. Dieses Lysin an Position 419 im GR zu deletieren würde theoretisch bedeuten, die Bindung des GR an Trip6 zu zerstören. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Bindung von GR an Trip6 zur Repression benötigt wird, wäre es interessant, das Verhalten dieser GR-Mutante in der Transrepression zu untersuchen. Diese Mutante sollte zur Transrepression nicht mehr in der Lage sein.

3.12 Das Lysin unmittelbar vor dem 1. Zinkfinger-koordinierenden Cystein ist hochkonserviert in der Familie der nukleären Rezeptoren

Neben dem GR sind auch andere nukleäre Rezeptoren zur Transrepression in der Lage. Es existieren aber auch nukleäre Rezeptoren, die diese Fähigkeit nicht aufweisen. Bisher wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der GR die Interaktion mit nTrip6 zur Repression benötigt und dass für diese Interaktion das Lysin an GR Position 419 unerlässlich ist.

Es soll untersucht werden, ob auch andere nukleäre Rezeptoren dieses Lysin unmittelbar vor dem 1. Zinkfinger-koordinierenden Cystein besitzen. Abbildung 31 zeigt Ausschnitte aus der Aminosäuresequenz des Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- und Androgen-Rezeptors.

GR:	SSSSTATGPPP ^K LC
MR:	VSSSTLRVSTGSSRPS ^K IC
AR:	ETARDHVLPIDYYFPPY ^K TC

Abb.31: Das Lysin ist hochkonserviert bei verschiedenen Steroidhormon-Rezeptoren

Hier wurden die Sequenzen des Glukokortikoid-Rezeptors, Mineralkortikoid-Rezeptors und Androgen-Rezeptors verglichen. Das C an letzter Position bezeichnet jeweils das Zinkfinger-koordinierende Cystein des 1. Zinkfingers der DNA-Bindedomäne des jeweiligen Rezeptors. Bei dem farblich markierten K handelt es sich um das Lysin, das den GR zur Interaktion mit Trip6 befähigt bzw. um die konservierte Aminosäure in der Sequenz des MR und AR.

Das Lysin ist in vielen Familienmitgliedern der nukleären Rezeptoren konserviert, gleichgültig, ob sie zur Transrepression befähigt sind oder nicht. Der MR zum Beispiel ist nicht in der Lage zur Transrepression, besitzt aber ein Lysin vor dem 1. Zinkfinger.

3.13 Das Lysin kurz vor dem Zinkfinger allein reicht nicht aus zur Interaktion mit Trip6

Nun soll untersucht werden, ob das Vorhandensein des Lysins an der Position kurz vor dem koordinierenden Cystein des 1. Zinkfingers der DBD alle diese Rezeptoren dazu befähigt mit Trip6 zu interagieren. Zu diesem Zweck werden mit der Spot-Technologie die 15 Aminosäuren vor dem ersten Zinkfinger verschiedener Steroidhormonrezeptoren auf eine Membran gebunden und auf Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Interaktion getestet wie unter Kapitel 3.9.1 beschrieben.

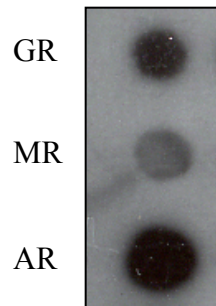


Abb.32: Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ interagiert mit den Steroidhormonrezeptoren, die zur Repression befähigt sind

Mit Hilfe der Spot-Technologie wurden die unter Abb.31 dargestellten Sequenzen des Glukokortikoid-Rezeptors, Mineralkortikoid-Rezeptors und Androgen-Rezeptors auf eine Zellulose-Membran gespottet. Diese Membran wurde auf Interaktion mit einem GST-Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶-Fusionsprotein getestet. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen anti-GST-Antikörper.

3.14 Trip6-Bindung und Repressionsfähigkeit hängen zusammen

Vor dem ersten Zinkfinger aller untersuchten Rezeptoren steht das Lysin an dritter Position. Zur Bindung an Trip6¹⁹⁰⁻⁴⁷⁶ sind nur die Rezeptoren in der Lage, die tatsächlich als zur Transrepression fähig beschrieben wurden. Rezeptoren, die nicht an Trip6 binden, können nicht reprimieren, auch wenn sie ein konserviertes Lysin haben. Das bestätigt die Aussage, dass das Lysin vor dem ersten Zinkfinger zur Repression benötigt wird, aber nicht ausreicht. Die Transrepressionsfähigkeit wird nicht allein durch eine einzelne Aminosäure vermittelt, sondern mit Hilfe von zusätzlichen Faktoren. Ohne das Lysin findet in keinem Fall Interaktion mit Trip6 statt.

Ergebnisse

4 Diskussion

In dieser Arbeit gelang die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung einer neuen kernspezifischen Isoform des fokalen Adhäsionsmoleküls Trip6, die wir als nTrip6 bezeichnen. nTrip6 vermittelt eine Koaktivator-ähnliche Funktion. Rekrutiert an die Promotor-gebundenen Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B bzw. GR vermittelt oder bindet nTrip6 zusätzliche Koaktivatoren. nTrip6 ist auch für die Transrepression von AP-1 bzw. NF- κ B durch GR und von GR durch AP-1 bzw. NF- κ B unerlässlich. Gleichzeitig an nTrip6 gebundene reprimierende Faktoren, wie der GR bei Repression von AP-1, verändern die Funktion der transaktivierenden Komplexe von einem aktivierten in einen reprimierten Status.

4.1 nTrip6 ist ein nukleäres Protein

Trip6 ist ein Klasse III Lim-Domänen-Protein und gehört zur Zyxin-Familie der fokalen Adhäsionsmoleküle (*focal adhesion molecules*). Lim-Domänen sind doppelte Zinkfingerstrukturen, die als Interaktionsmodule Protein-Protein-Kontakte vermitteln (Schmeichel and Beckerle, 1994). Proteine, die diese Strukturen aufweisen, sind für zahlreiche unterschiedliche Funktionen bekannt, z.B. als Regulatoren für Genexpression, zelluläre Architektur, Zelladhäsion, Zellbeweglichkeit und Signaltransduktion (Bach, 2000; Dawid et al., 1998; Kadrmas and Beckerle, 2004). Zur Klasse III gehören Proteine unterschiedlicher Anzahl an Lim-Domänen, die hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind wie die Zyxin- oder Paxillin-Familie (Dawid et al., 1998).

Die Mitglieder der Zyxin-Familie, zu der Zyxin, LPP, Trip6 und Ajuba zählen, werden in Fokalkontakten gefunden. Dies sind Strukturen, die sich an der Innenseite von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix- Kontaktstellen bilden. Diese Multiproteinkomplexe sind in Signaltransduktion involviert, z.B. indem sie Protein-Phosphorylierung vermitteln (Turner, 2000) oder als Binde-Plattform für Proteine des Signalwegs wirken (Matsuya et al., 1998).

Trip6 wird als zytoplasmatisches Protein (Nix and Beckerle, 1997; Wang and Gilmore, 2001) beschrieben und kommt als Bestandteil der Multiproteinkomplexe an Fokalkontaktstellen vor. Auch ist es kolokalisiert mit F-Aktin entlang von Aktinfilamenten, wahrscheinlich zur Regulation der Dynamik des Zytoskeletts (Cuppen et al., 2000). Die zytoplasmatische Lokalisation von Trip6 lässt sich durch ein starkes nukleäres Exportsignal (NES) im N-Terminus erklären (Nix and Beckerle, 1997; Wang and Gilmore, 2001). Deletion dieses NES führt zur Anreicherung von Trip6 im Zellkern (Wang and Gilmore, 2001).

Behandlung von Zellen mit Leptomycin B (verhindert Crm1-abhängigen Kernexport) führt ebenfalls zur Akkumulation von Trip6 im Zellkern. Daraus resultiert die Theorie, dass Crm1 den Kernexport von Trip6 und damit ein Pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma reguliert (Wang and Gilmore, 2001). Da dies bereits für andere Proteine dieser Familie, z.B. Zyxin, beschrieben ist (Nix and Beckerle, 1997), könnten diese Lim-Domänen-Proteine als sogenannte Biosensoren wirken und durch Pendeln zwischen den Zellkompartimenten die Kommunikation zwischen Zytoplasma und Zellkern vermitteln (Kadmas and Beckerle, 2004; Wang and Gilmore, 2003a).

In dieser Arbeit wurde dies nicht bestätigt. Es ergab sich keinerlei Hinweis, dass Trip6 zwischen Zytoplasma und Zellkern wandert. Stattdessen konnte die Existenz verschiedener Trip6-Isoformen bewiesen werden (Abbildungen 3 und 4). Mindestens zwei Isoformen unterschiedlicher molekularer Größe befinden sich im Zytoplasma. Die größere entspricht dem kompletten Trip6-Protein von 476 Aminosäuren. Für dieses Protein wurden bereits Funktionen in Fokalkontakten beschrieben. Die zweite zytoplasmatische Isoform ist etwas kleiner. Möglicherweise ist diese Isoform involviert in noch unbekannte Modulationen anderer zytoplasmatischer Funktionen.

Die kleinste detektierte Trip6-Isoform befindet sich exklusiv nur im Zellkern und wurde daher von uns nTrip6 genannt. nTrip6 ist die erste entdeckte nukleäre Isoform der Zyxin-Familie. nTrip6 ist nur im Kern lokalisiert; Verteilung und Menge aller detektierten Trip6-Isoformen auf die Zellkompartimente sind unter den Bedingungen der hier beschriebenen Experimente nicht moduliert, z.B. von AP-1, GR oder NF- κ B. Die nukleäre Isoform konnte unter keinen Versuchsbedingungen im Zytoplasma lokalisiert werden. Dies schließt ein Pendeln von Trip6 zwischen den Zellkompartimenten definitiv aus.

Es stellt sich die Frage, aufgrund welches molekularen Mechanismus die Trip6-Isoformen gebildet werden. Zur spezifischen Reduktion der Trip6-Proteinmenge wurden verschiedene si-Oligomere eingesetzt. Interessanterweise reduzierte ein si-RNA-Oligomer hauptsächlich die zytoplasmatische Trip6-Isoform, die dem kompletten Protein entspricht, während sich ein zweites si-RNA-Oligomer deutlicher auf nTrip6 (Kassel et al., 2004) auswirkte. Dies lässt auf die Existenz unterschiedlicher mRNA-Moleküle schließen und führt zu der Vermutung, dass nTrip6 aufgrund alternativen Spleißens entsteht.

Tatsächlich konnten in HeLa-Zellen verschiedene Trip6-mRNA-Moleküle detektiert werden. Datenbanken geben Aufschluss über die potentielle Existenz verschiedener Trip6-Spleiß-Varianten; dazu gehören auch Formen, denen das NES-enthaltende Exon fehlt. Nun muss bewiesen werden, dass eines dieser mRNA-Moleküle tatsächlich für nTrip6 kodiert.

4.2 nTrip6 besitzt eine Koaktivator-ähnliche Funktion für AP-1, NF- κ B und GR

Für die neuartige, kernspezifische Trip6-Isoform nTrip6 wurde in dieser Arbeit eine Koaktivator-ähnliche Funktion bewiesen. nTrip6 besitzt deutliche Merkmale eines „*bona fide*“ Koaktivators:

- 1) nTrip6 bindet an andere Transkriptionsfaktoren. Trip6 interagiert mit dem GR sowie AP-1 und NF- κ B *in vitro* (Abbildung 6) und *in vivo* (Kassel et al., 2004). Durch diese Bindung ist nTrip6 am Promotor von Zielgenen lokalisiert (Abbildung 12, 13 und 14).
- 2) Überexpression von Trip6 verstärkt die Transaktivierung. Dies führte in Reporter-Experimenten zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität von durch GR, AP-1 und NF- κ B-regulierten Reporter-Genen (Abbildung 23). Außerdem stellt die Trip6-Proteinmenge einen limitierenden Faktor in der Transaktivierung dar. Dies bewiesen Reporter-Experimente auf einem endogenen Zielgen in Trip6-reduzierten Zellen (Kassel et al., 2004).

- 3) Trip6 besitzt eine eigenständige Aktivatorfunktion. Dies wurde mit Trip6-GAL4-DBD-Fusionsproteinen in Reporter-Experimenten nachgewiesen (Kassel et al., 2004; Wang and Gilmore, 2001)

Diesen Argumenten zufolge besitzt Trip6 eindeutig Eigenschaften eines Koaktivators. Auch andere Lim-Domänen-Proteine sind für ihre Koaktivator-Funktion bekannt. Es existieren LMO-Proteine, die nur Lim-Domänen enthalten („*Lim-only proteins*“) und direkt in Transkription involviert sind. Z.B. ist LMO2 ein Koaktivator für den Transkriptionsfaktor GATA-1 (Osada et al., 1997). Eine Unterklasse dieser Proteine bilden die FHL („*Four and half LIM domain protein*“). Sie bestehen aus vier und einer halben Lim-Domäne. Einige Mitglieder dieser Familie, wie z. B. FHL2, besitzen eine Koaktivatorfunktion, obwohl sie nur aus Lim-Domänen aufgebaut sind. Sie modulieren die Aktivität des Androgen Rezeptors, CREB (Muller et al., 2000) und AP-1 (Morlon and Sassone-Corsi, 2003).

Hic5/ARA55 ist wie Trip6 ein Klasse III Lim-Domänen-Protein und als Adaptor-Molekül in Fokalkontakte involviert. Hic5/ARA55 ähnelt in Funktion und Aufbau Paxillin und ist gleichzeitig ein Koaktivator für Steroidrezeptoren, z. B. GR und AR (Kasai et al., 2003; Yang et al., 2000).

Dies wäre auch eine mögliche Funktion für nTrip6. Allerdings zeigt die Proteinsequenz von Trip6 weder eine Domäne, die zur Transaktivierung befähigen könnte, noch ein Motiv zur katalytischen Aktivität, wie z.B. zur Histon-Modifikation. Es ist daher unwahrscheinlich, dass nTrip6 selbst Einfluss auf transkriptionelle Aktivität ausübt. Die einzige bekannte funktionelle Struktur von Trip6 sind die Lim-Domänen, die zur Protein-Protein-Interaktion genutzt werden. Wahrscheinlich kann nTrip6 selbst nicht als Koaktivator agieren, sondern es rekrutiert Proteine mit Koaktivator-Funktion. D.h. nTrip6 rekrutiert über seine multiplen Lim-Domänen echte, transkriptionell aktive Kofaktoren oder Kofaktor-Komplexe durch Protein-Protein-Interaktion. Dass Lim-Domänen mit Koaktivatoren interagieren können, wurde erst kürzlich für FHL2 beschrieben (Labalette et al., 2004). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Trip6-Mutante mit fehlender Lim 1-Domäne nicht mehr zur Koaktivierung eines GR-regulierten Gens in der Lage ist (Abbildung 25), obwohl sie an den Promotor gebunden ist. Diese

Lim-Domäne selbst besitzt keinerlei aktivierende Funktion, aber sie könnte Kofaktoren rekrutieren.

Trip6 im Zytoplasma ist ein Bestandteil des Multiproteinkomplexes an Fokalkontaktstellen. Dort agiert es aufgrund seiner multiplen Protein-Protein-Interaktionsdomänen als Brückenfaktor für Proteine verschiedenster Funktion und ermöglicht deren Zusammenarbeit. Die gleiche Funktion besitzt nTrip6 im Zellkern. Durch Bindung an nTrip6 können Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren am Promotor lokalisieren, so dass diese Proteine zur transkriptionellen Kontrolle befähigt werden.

Trip6 zeigt eine Spezifität bei der Interaktion mit AP-1- bzw. NF- κ B-Familienmitgliedern. Je nach Zusammensetzung der Dimere aus den einzelnen Mitgliedern werden bei beiden Familien verschiedene Zielgene aktiviert. Z.B. binden Jun-Fos-Dimere, die über Fos-Familienmitglieder nTrip6 binden können, mit höherer Affinität an TRE-Elemente, während cJun-ATF-Dimere, die nicht zur Interaktion mit nTrip6 in der Lage sind, CRE-Sequenzen bevorzugen (Bakiri et al., 2002; Chinenov and Kerppola, 2001). Je nach Zusammensetzung der Dimere ergeben sich zahlreiche unterschiedliche Funktionen, die Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Onkogenese betreffen. Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde beschrieben, dass die jeweilige Promotor-Sequenz NF- κ B-regulierter Zielgene genau spezifiziert, welche Dimer-Kombinationen binden können. Diese Promotor-Sequenz legt zusätzlich bereits fest, welche Koaktivatoren in den Prozess eingebunden werden (Leung et al., 2004). nTrip6 bindet nur an AP-1-Dimere, die Mitglieder der Fos-Familie als Untereinheit besitzen. Bei NF- κ B scheint die Bindspezifität bei p50 zu liegen.

Da nTrip6 spezifisch mit einzelnen Proteinen dieser Familien interagiert, findet so vielleicht nur eine Koaktivierung ganz bestimmter Dimere dieser Transkriptionsfaktoren statt. Die Untersuchung dieser Zielgene könnte somit Aufschluss auf die *in vivo* Funktion von nTrip6 geben. Sehr interessant wäre der Nachweis, ob nur diese Zielgene durch den GR reprimiert werden können. Vorläufige Versuchsansätze (Marc Castelazzi, unveröffentlichte Daten) deuten darauf hin, dass hauptsächlich Fos enthaltende AP-1-Transkriptionsfaktoren durch GR reprimiert werden könnten. Weil nur sie an Trip6 binden?

4.3 nTrip6 ist zur Transrepression unerlässlich

nTrip6 besitzt nicht nur eine Koaktivator-ähnliche Funktion, sondern ist auch zur Transrepression unerlässlich. Was für eine Rolle spielt nTrip6 in diesem Prozess? Der GR ist bei der Transrepression am Promotor der reprimierten Gene lokalisiert (Nissen and Yamamoto, 2000; Rogatsky et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nTrip6 diese Bindung von GR an den Promotor vermittelt. Der GR bindet dabei nicht direkt an den am Promotor-gebundenen Transkriptionsfaktor, sondern über nTrip6.

Eine Trip6-Mutante mit fehlendem Lim 3-Zinkfinger (diese Lim-Domäne bindet spezifisch an GR (Abbildung 9)) ist immer noch erfolgreich in Koaktivator-ähnlicher Funktion am Promotor von AP-1- und NF- κ B-regulierten Reportergenen lokalisiert. Aber die Aktivität dieser Gene kann nicht mehr durch GR reprimiert werden. Dieser Effekt zeigte sich auch in Zellen, deren Trip6-Proteingehalt reduziert wurde. Die Rekrutierung von GR an einen AP-1-regulierten Promotor war deutlich reduziert (Abbildung 18). Zusammenfassend beweist dies, dass der GR über seine Bindung an nTrip6 an den zu reprimierenden Promotor gebunden wird.

Damit wurde der fehlende Faktor gefunden, der erklärt, wie der GR zur Transrepression am Promotor lokalisiert ist. nTrip6 wirkt dabei als molekulare Plattform und vermittelt die funktionelle Interaktion der beteiligten Transkriptionsfaktoren.

Die Repression von AP-1 und NF- κ B beruht demzufolge auf demselben Mechanismus. Der GR ist über die Bindung an nTrip6 am AP-1- bzw. NF- κ B-regulierten Promotor lokalisiert. Dies erklärt, warum bislang keine klaren Beweise für eine direkte Interaktion zwischen dem GR und AP-1 *in vivo* erbracht wurden. Transrepression kann in Hefe trotz funktioneller Transkriptionsfaktoren AP-1 und GR nicht rekonstituiert werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass Hefezellen kein Trip6 exprimieren. Dadurch kann der GR nicht an AP-1 rekrutiert werden und somit findet keine Repression statt. Es wäre zu überprüfen, ob Einbringen von Trip6 in Hefe Transrepression von AP-1 durch den GR ermöglicht.

Wie bereits seit langem bekannt (König et al., 1992; Nissen and Yamamoto, 2000; Rogatsky et al., 2001), beruht der Transrepressionsmechanismus nicht auf dem Verdrängen der aktivierenden Transkriptionsfaktoren AP-1 bzw. NF- κ B von der Promotorbindestelle. Dies konnte bestätigt

werden (Abbildung 12, 13 und 14). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass dies auch für die Repression des GR durch AP-1 gilt. Der GR bleibt nach Aktivierung von AP-1 am Promotor gebunden (Abbildung 27). Zur Transrepression von durch AP-1 bzw. NF- κ B-regulierten Genen muss der GR an den Promotor rekrutiert werden. In dieser Arbeit wurde bewiesen, dass bei der Transrepression von durch GR regulierten Genen dies auch für AP-1 gilt und AP-1 an den zu reprimierenden GRE-Promotor gebunden werden muss. nTrip6 ist auch hier die Plattform, die diese Bindung ermöglicht (Abbildung 27). Das bedeutet allgemein, die reprimierten Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und der GR bleiben bei der Repression an den Promotor gebunden, wenn der die Repression vermittelnde Faktor GR, bzw. AP-1 über nTrip6 rekrutiert wird.

Der erste Schritt der Transrepression besteht in der Bindung des reprimierenden Transkriptionsfaktors an nTrip6. Diese Interaktion ist unbedingt erforderlich, reicht aber zur funktionellen Repression nicht aus (Abbildung 22). Wie der exakte Mechanismus abläuft, ist noch unbekannt. Prinzipiell bieten sich mehrere Möglichkeiten an:

- 1) Konkurrenz um limitierende Mengen an Koaktivator, z. B. um Bindung an nTrip6 zwischen dem aktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktor. Der reprimierende Transkriptionsfaktor würde dabei die Koaktivator-ähnliche Funktion von nTrip6 behindern. Die Konkurrenz um andere Koaktivatoren, wie z.B. p300/CBP oder SRC1, wurde ebenfalls als Grund für das Auftreten von Transrepression vermutet (Kamei et al., 1996; Sheppard et al., 1998a). Beide Theorien wurden jedoch widerlegt, da Überexpression von nTrip6 sowie von p300/CBP keinen Einfluss auf Repression hatte (De Bosscher et al., 2001; De Bosscher et al., 2000b; Kassel et al., 2004; McKay and Cidlowski, 2000). Als zusätzlicher Beweis existieren GR-Mutanten, die nicht mehr zur Interaktion mit Koaktivatoren in der Lage sind (GRmH12deltaAF-1), aber immer noch transreprimieren (Kassel et al., 2004). Diese Punkte schließen Konkurrenz um einen Kofaktor als Mechanismus der Transrepression aus.

- 2) Der GR blockiert die Rekrutierung von Koaktivatoren. Dies konnte für einige Faktoren widerlegt, aber nicht umfassend für jeden möglichen Faktor bewiesen werden. Dagegen spricht aber auch, dass die GR-vermittelte Repression eines NF- κ B-abhängigen Promotors zeitlich erst nach Bindung der Koaktivatoren und Bildung des Prä-Initiations-Komplexes auftreten soll (Nissen and Yamamoto, 2000).
- 3) Der GR rekrutiert zusätzliche Faktoren mit reprimierender Aktivität. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um Histon-Deacetylasen (HDAC), da HDAC-Inhibitoren wie TSA die GR-abhängige Transrepression nicht beeinflussen (Vanden Berghe et al., 2002). Ein zusätzlicher Faktor könnte die Initiierung oder Elongation der Transkription verhindern. Z.B. ist TIFII/GRIP1 ein Koaktivator für den GR, der auch in dessen Korepression funktionell eingebunden ist (Rogatsky et al., 2001). Auch durch Rekrutierung des GR an Promotor-gebundenes nTrip6 findet ein Wechsel der Koaktivator-ähnlichen zu einer Transrepression-vermittelnden Funktion statt. Dies lässt vermuten, dass die Zusammensetzung regulatorischer Komplexe und deren biologischer Aktivität, wie die Transrepression, dynamisch ist und die Funktion dieser Faktoren vom Zell- sowie Promotortyp abhängt.

Trip6 wurde zuerst identifiziert als Protein unbekannter Funktion, das aber mit dem TR und dem RXR interagiert (Lee et al., 1995). TR und RXR reprimieren AP-1 (Schüle et al., 1991). Es wurde daher der Schluss gezogen, dass die Interaktion mit Trip6 einen allgemeinen Mechanismus darstellt, aufgrund dessen verschiedene nukleäre Rezeptoren AP-1 reprimieren können. Es existieren jedoch auch nukleäre Rezeptoren, die nicht zur Transrepression von AP-1 in der Lage sind. Für die nukleären Rezeptoren AR, MR und GR konnte bestätigt werden, dass nur AR und GR, die tatsächlich reprimieren, auch mit Trip6 interagieren können (Abbildung 32).

4.4 Untersuchung von GR-Domänen

Nukleäre Rezeptoren sind komplexe Proteine mit mehreren Domänen. Einige haben deutliche Fernwirkung auf andere Domänen. So entscheidet zum Beispiel das DNA-Element, an das der GR

bindet, über seine Transkriptionsaktivität. Die Ligandenbindung setzt die NLS frei und öffnet die Aktivatorfunktion AF2. Deshalb verwundert es nicht, dass die Transrepressionswirkung des GR nicht durch eine einzelne seiner funktionellen Domänen vermittelt wird. Vielmehr ist eine Vielzahl struktureller Elemente bekannt, die involviert sind. Für die Transrepression von AP-1 und NF- κ B wird die DBD benötigt (Heck et al., 1994; Jonat et al., 1990; McKay and Cidlowski, 1998; Scheinman et al., 1995b; Schüle et al., 1990), denn Punktmutationen in dieser Region (C476W und R479Q=GRmDBD) zerstören GR-vermittelte Repression (Heck et al., 1994; Kassel et al., 2004)). Die Mutante GRmDBD interagiert nicht mit Trip6 (Kassel et al., 2004) und mit Hilfe von *in vitro*-Interaktionsstudien wurde ermittelt, dass die GR-DBD für die Interaktion mit Trip6 notwendig ist (Abbildung 28).

Damit ist ein weiterer Beweis für die Notwendigkeit der Bindung von GR mit nTrip6 zur Transrepression erbracht. Die DBD des GR stellt eine wichtige Interaktionsoberfläche dieser Funktion dar, könnte aber allein die Repression von AP-1 nicht ermöglichen, denn Austausch der DBD des nicht reprimierenden MR mit der DBD des reprimierenden GR befähigt diese MR-Mutante nur partiell zur Repression von AP-1 (Heck et al., 1994; Pearce and Yamamoto, 1993). Das deutet darauf hin, dass zusätzliche Domänen zur Repression benötigt werden; zum Beispiel DBD-benachbarte Regionen. Schrittweise Deletion N-terminal der DBD führte bei einigen Mutanten zu einer Verminderung der Repressionsfähigkeit im Reporter-gen-Assay (Wade, Heck, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit konnte ich beweisen, dass das Lysin an Position 419 des GR zur Interaktion mit Trip6 benötigt wird (Abbildung 30) und diese Bindung an Trip6 zur Repression nötig ist. Ein erneuter Austausch funktioneller MR- und GR-Domänen sollte den N-terminalen Bereich der DBD, der die Bindestelle mit Trip6 an Position 419 enthält, berücksichtigen. Es wäre interessant, ob der MR dann in der Lage ist, mit Trip6 zu interagieren und ob dies dazu führt, dass AP-1 durch diese MR-Mutante vollständig reprimiert werden kann. Deletion der AF1 führt zur Reduktion der Transaktivierung durch GRE-regulierte Gene, beeinträchtigt jedoch nicht die Transrepression (Kassel et al., 2004). Eine komplette Deletion der LBD/AF2 zerstört die Repression von AP-1 und NF- κ B (Jonat et al., 1990; McKay and Cidlowski, 1998; Nissen and Yamamoto, 2000; Schüle et al., 1990). Dies liegt wahrscheinlich

darin begründet, dass die LBD/AF2 die Ligandenbindung vermittelt und damit die hormonabhängige Aktivierung des GR, da die AF2 nicht zur Transrepression benötigt wird. GR-Mutanten, die von uns hergestellt wurden und die Helix 12 der AF2 zerstören, können nicht mehr transaktivieren, sind aber zur Transrepression noch in der Lage (Kassel et al., 2004; Kucera et al., 2002; Ray et al., 1999). Auch Deletion der AF1 mit gleichzeitiger funktioneller Zerstörung der AF2 in der Mutante GRmH12deltaAF1 führen zum Verlust der Transaktivierung durch GRE-regulierte Gene, da diese Mutante nicht mehr mit AF-1-abhängigen Koaktivatoren sowie dem AF2-abhängigen Koaktivator Src-1 (Kucera et al., 2002) interagieren kann. Doch die Mutante GRmH12deltaAF1 kann transreprimieren. Dadurch wird erneut bestätigt, dass die transaktivierende Funktion des GR nicht zur Transrepression benötigt wird und dass Transrepression nicht aufgrund von Konkurrenz mit bekannten Koaktivatoren stattfindet. Trip6 interagiert mit der LBD/AF2 (Abbildung 28). Da diese Domäne aber nicht zur Transrepression benötigt wird, beruht diese Interaktion möglicherweise eher auf der Koaktivator-ähnlichen Funktion von nTrip6 auf GRE-regulierte Gene (Abbildung 23).

In dieser Arbeit wurde eine neue GR-Domäne entdeckt, die mit Trip6 interagiert und aufgrund dessen zur Transrepression notwendig sein könnte. Diese Domäne befindet sich unmittelbar vor der DBD (Abbildung 29). Die Annahme, dass die Interaktion von nTip6 mit dieser Domäne zur Transrepression unbedingt erforderlich ist, wurde unterstützt durch unsere Beobachtung, dass dieselbe Domäne des MR, der AP-1 nicht transreprimiert, nicht mit Trip6 interagieren kann (Abbildung 32). Um dies zu bestätigen, sollte diese Domäne mutiert werden, um die Interaktion mit Trip6 zu zerstören und zu untersuchen, ob diese Mutation Transrepression verhindert. Bereits die Punktmutation an Position 419 von Lysin zu Alanin zerstört die Interaktion mit Trip6 (Abbildung 30). Diese Mutante sollte noch zur Transaktivierung in der Lage sein, da zwei verschiedene Punktmutationen in dieser Domäne keinen Einfluss auf Transaktivierung haben (Luisi et al., 1991; Segard-Maurel et al., 1992). Dies wäre das Gegenstück zur bereits existierenden GR-Dim-Mutante, die nicht mehr transaktiviert, sondern nur noch transreprimieren kann (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999). Mit dieser Mutante könnte der durch GR vermittelte Transrepressionsprozess optimal untersucht werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nTrip6 als ein neuartiger Regulator der Transkription entdeckt. Aufgrund zahlreicher Interaktions-Domänen vermittelt nTrip6 die Zusammenarbeit von Multi-Protein-Komplexen am Promotor von Zielgenen. Je nach Verfügbarkeit der interagierenden Partnerproteine, wie zum Beispiel dem GR, werden verschiedene Komplexe gebildet, welche die Transkription entweder unterstützen oder unterdrücken.

4.5 Physiologische Bedeutung

Glukokortikoide sind sehr wirksame anti-inflammatorische und immunsuppressive Substanzen und spielen eine entscheidende Rolle in der physiologischen Regulation der Immunfunktion des menschlichen Körpers. Aufgrund dieser Wirkung finden sie weit verbreitete therapeutische Anwendung, zum Beispiel in der Behandlung akuter oder chronischer Infektionen. Vor allem Langzeitanwendungen von Glukokortikoiden sind begleitet von schwerwiegenden Nebenwirkungen. Ein besseres Verständnis der GR-Funktion ist deshalb wünschenswert. nTrip6 spielt eine entscheidende Rolle im molekularen Mechanismus der GR-vermittelten Repression der Aktivität von AP-1 und NF- κ B. Auf der Basis der hier gewonnenen Erkenntnisse wird es möglich sein Mausmodelle zu erzeugen, welche die Rolle der Transrepression im Organismus eindeutig bestimmen.

5 Literatur

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729-739.

Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **1072**, 129-157.

Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. and Montminy, M. (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, **370**, 226-229.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A. and Karin, M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, **270**, 286-290.

Bach, I. (2000) The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, **91**, 5-17.

Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E.F. and Yaniv, M. (2002) Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. **22**, 4952-4964.

Bannister, A.J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P. and Kouzarides, T. (1995) Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene*, **11**, 2509-2514.

Barnes, P.J. (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, **94**, 557-572.

Barnes, P.J. and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **336**, 1066-1071.

Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**, 335-344.

Beato, M., Herrlich, P. and Schutz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **83**, 851-857.

Berger, S.L. (1999) Gene activation by histone and factor acetyltransferases. **11**, 336-341.

- Boumpas, D.T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Cupps, T.R. and Balow, J.E. (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **119**, 1198-1208.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, **375**, 377-382.
- Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Stroka, D., Soares, M., Bach, F.H. and Winkler, H. (1996) Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis. **271**, 19612-19616.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J.M. and Munoz, A. (1997) Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*, **11**, 3351-3364.
- Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., Van de, S.A., Raaijmakers, J., Koenderman, L., Okret, S., Gustafsson, J.A. and van der Saag, P.T. (1995) Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. **9**, 401-412.
- Carlstedt-Duke, J., Stromstedt, P.E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J.A. and Jornvall, H. (1988) Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors. **263**, 6842-6846.
- Cato, A.C., König, H., Ponta, H. and Herrlich, P. (1992) Steroids and growth promoting factors in the regulation of expression of genes and gene networks. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **43**, 63-68.
- Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R.M. (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, **383**, 99-103.
- Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, **20**, 2438-2452.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. and Schutz, G. (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev*, **9**, 1608-1621.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D. and Wolffe, A.P. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. **23**, 255-275.

- Cuppen, E., van Ham, M., Wansink, D.G., de Leeuw, A., Wieringa, B. and Hendriks, W. (2000) The zyxin-related protein TRIP6 interacts with PDZ motifs in the adaptor protein RIL and the protein tyrosine phosphatase PTP-BL. *Eur J Cell Biol*, **79**, 283-293.
- Cutroneo, K.R. and Sterling, K.M., Jr. (1986) A molecular basis for bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **89**, 121S-122S.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A. and Carlstedt-Duke, J. (1991) Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. **266**, 3107-3112.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. and Parker, M.G. (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. **11**, 1025-1033.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J. and Yamamoto, K.R. (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. **12**, 3343-3356.
- Dawid, I.B., Breen, J.J. and Toyama, R. (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*, **14**, 156-162.
- De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W. and Haegeman, G. (1997) Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13504-13509.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2000a) Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol*, **109**, 16-22.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2001) Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. *Mol Endocrinol*, **15**, 219-227.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E. and Haegeman, G. (2000b) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3919-3924.
- De Cesare, D., Vallone, D., Caracciolo, A., Sassone-Corsi, P., Nerlov, C. and Verde, P. (1995) Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene*, **11**, 365-376.

- DeFranco, D.B., Ramakrishnan, C. and Tang, Y. (1998) Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *65*, 51-58.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. and Yamamoto, K.R. (1990) Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*, **249**, 1266-1272.
- Dittmar, K.D. and Pratt, W.B. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *272*, 13047-13054.
- Dostert, A. and Heinzl, T. (2004) Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. **10**, 2807-2816.
- Dumont, A., Hehner, S.P., Schmitz, M.L., Gustafsson, J.A., Liden, J., Okret, S., van der Saag, P.T., Wissink, S., van der Burg, B., Herrlich, P., Haegeman, G., De Bosscher, K. and Fiers, W. (1998) Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trends Biochem Sci*, **23**, 233-235.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.
- Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B. and Yamamoto, K.R. (1988) The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, **334**, 543-546.
- Fryer, C.J. and Archer, T.K. (1998) Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, **393**, 88-91.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **16**, 225-260.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **14**, 121-141.
- Googwin, J.S. (1994) Antiinflammatory drugs. In D. P. Stites, A. I. Terr, T. G. Parslow (Eds). Vol. 8th edn., pp. 786-795.

- Granner, D.K. and Hargrove, J.L. (1983) Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase: the relationship to mRNATAT. **53-54**, 113-128.
- Hai, T.W., Liu, F., Coukos, W.J. and Green, M.R. (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. **3**, 2083-2090.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R. and Brown, M. (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. **93**, 11540-11545.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Göttlicher, M., Herrlich, P. and Cato, A.C. (1997) I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J*, **16**, 4698-4707.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. and Cato, A.C. (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J*, **13**, 4087-4095.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. (1993) Identification of an oncopro. **7**, 2135-2148.
- Hollenberg, S.M. and Evans, R.M. (1988) Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, **55**, 899-906.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S. and Tung, L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*, **10**, 1167-1177.
- Ihle, R. (1989) Therapeutische Grundlagen. In Stobbe, H. and Heinrich, H.G. (eds.). F. H. Schulz, & H. Stobbe (Eds.), Berlin: Volk und Gesundheit, pp. 42-81.
- Jenkins, B.D., Pullen, C.B. and Darimont, B.D. (2001) Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 122-126.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **62**, 1189-1204.
- Jurata, L.W. and Gill, G.N. (1998) Structure and function of LIM domains. **228**, 75-113.
- Kadmas, J.L. and Beckerle, M.C. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. **5**, 920-931.

- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, **85**, 403-414.
- Kang, K.I., Meng, X., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., Chadli, A., Cadepond, F., Baulieu, E.E. and Catelli, M.G. (1999) The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. **96**, 1439-1444.
- Karin, M. and Ben Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **18**, 621-663.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R. and Li, Z.W. (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **2**, 301-310.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M. and Beato, M. (1984) Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature*, **308**, 513-519.
- Karin, M. and Saatcioglu, F. (1997) Negative Transcriptional Regulation by the Glucocorticoid Receptor is Responsible for the Anti-Inflammatory Activity of Glucocorticoids. *Inhaled Glucocorticoids in Asthma, New York*, 29-52.
- Kasai, M., Guerrero-Santoro, J., Friedman, R., Leman, E.S., Getzenberg, R.H. and DeFranco, D.B. (2003) The Group 3 LIM domain protein paxillin potentiates androgen receptor transactivation in prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, **63**, 4927-4935.
- Kassel, O., Schneider, S., Heilbock, C., Litfin, M., Göttlicher, M. and Herrlich, P. (2004) A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF- κ B-regulated promoters. *Genes Dev*, **18**, 2518-2528.
- Kerppola, T.K., Luk, D. and Curran, T. (1993) Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. **13**, 3782-3791.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J. and Herrlich, P. (1992) Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *Embo J*, **11**, 2241-2246.
- Kucera, T., Waltner-Law, M., Scott, D.K., Prasad, R. and Granner, D.K. (2002) A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol Chem*, **277**, 26098-26102.

- Labalette, C., Renard, C.A., Neuveut, C., Buendia, M.A. and Wei, Y. (2004) Interaction and Functional Cooperation between the LIM Protein FHL2, CBP/p300, and β -Catenin. **24**, 10689-10702.
- Lee, J.W., Choi, H.S., Gyuris, J., Brent, R. and Moore, D.D. (1995) Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*, **9**, 243-254.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. and Young, R.A. (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. **18**, 4455-4462.
- Leung, T.H., Hoffmann, A. and Baltimore, D. (2004) One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell*, **118**, 453-464.
- Lifton, R.P., Gharavi, A.G. and Geller, D.S. (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, **104**, 545-556.
- Lucibello, F.C., Slater, E.P., Jooss, K.U., Beato, M. and Muller, R. (1990) Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *Embo J*, **9**, 2827-2834.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R. and Sigler, P.B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **352**, 497-505.
- Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and al., e. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- Matsuya, M., Sasaki, H., Aoto, H., Mitaka, T., Nagura, K., Ohba, T., Ishino, M., Takahashi, S., Suzuki, R. and Sasaki, T. (1998) Cell adhesion kinase beta forms a complex with a new member, Hic-5, of proteins localized at focal adhesions. **273**, 1003-1014.
- McKay, L.I. and Cidlowski, J.A. (1998) Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*, **12**, 45-56.
- McKay, L.I. and Cidlowski, J.A. (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. **20**, 435-459.

- McKay, L.I. and Cidlowski, J.A. (2000) CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol*, **14**, 1222-1234.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **20**, 321-344.
- Morlon, A. and Sassone-Corsi, P. (2003) The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3977-3982.
- Muller, J.M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R. and Schule, R. (2000) FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J*, **19**, 359-369.
- Munck, A. and Holbrook, N.J. (1984) Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. Rapid kinetic behavior and a cyclic model. **259**, 820-831.
- Munck, A. and Naray-Fejes-Toth, A. (1994) Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. **746**, 115-130.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.G., Hurwitz, J., Parvin, J.D. and Montminy, M. (1997) RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*, **90**, 1107-1112.
- Nissen, R.M. and Yamamoto, K.R. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev*, **14**, 2314-2329.
- Nix, D.A. and Beckerle, M.C. (1997) Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol*, **138**, 1139-1147.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. **10**, 2657-2683.
- Osada, H., Grutz, G.G., Axelson, H., Forster, A. and Rabbitts, T.H. (1997) LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. **11 Suppl 3**, 307-312.

- Papavassiliou, A.G., Treier, M. and Bohmann, D. (1995) Intramolecular signal transduction in c-Jun. **14**, 2014-2019.
- Pearce, D. and Yamamoto, K.R. (1993) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science*, **259**, 1161-1165.
- Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. **6**, 3333-3340.
- Ponta, H., Gunzburg, W.H., Salmons, B., Groner, B. and Herrlich, P. (1985) Mouse mammary tumour virus: a proviral gene contributes to the understanding of eukaryotic gene expression and mammary tumorigenesis. **66 (Pt 5)**, 931-943.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J.R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**, 670-674.
- Ray, A. and Prefontaine, K.E. (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**, 752-756.
- Ray, D.W., Suen, C.S., Brass, A., Soden, J. and White, A. (1999) Structure/function of the human glucocorticoid receptor: tyrosine 735 is important for transactivation. *Mol Endocrinol*, **13**, 1855-1863.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. and Schutz, G. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, **93**, 531-541.
- Reichardt, H.M. and Schutz, G. (1998) Glucocorticoid signalling--multiple variations of a common theme. **146**, 1-6.
- Rogatsky, I., Zarembek, K.A. and Yamamoto, K.R. (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**, 6071-6083.
- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K. and Baldwin, A.S., Jr. (1995a) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286.
- Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. and Baldwin, A.S., Jr. (1995b) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, **15**, 943-953.

- Schmeichel, K.L. and Beckerle, M.C. (1994) The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, **79**, 211-219.
- Schneikert, J., Hubner, S., Martin, E. and Cato, A.C. (1999) A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. **146**, 929-940.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defosse, P.A., Klocker, H., Launoit, Y. and Cato, A.C. (1996) Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Biol Chem*, **271**, 23907-23913.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, **62**, 1217-1226.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Verma, I.M. and Evans, R.M. (1991) Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6092-6096.
- Segard-Maurel, I., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Cadepond, F. and Baulieu, E.E. (1992) Mutations in the "zinc fingers" or in the N-terminal region of the DNA binding domain of the human glucocorticosteroid receptor facilitate its salt-induced transformation, but do not modify hormone binding. **41**, 727-732.
- Shemshedini, L., Knauthe, R., Sassone-Corsi, P., Pornon, A. and Gronemeyer, H. (1991) Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. **10**, 3839-3849.
- Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E. and Collins, T. (1998a) Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*, **273**, 29291-29294.
- Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E. and Collins, T. (1998b) Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. **273**, 29291-29294.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. and Karin, M. (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, **354**, 494-496.

- Stromstedt, P.E., Poellinger, L., Gustafsson, J.A. and Carlstedt-Duke, J. (1991) The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. **11**, 3379-3383.
- Topert, M. (1988) Perspectives in corticosteroid research. **36 Suppl 5**, 1-8.
- Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schutz, G. and Angel, P. (1999) The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol*, **147**, 1365-1370.
- Turner, C.E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. **2**, E231-E236.
- Umesono, K. and Evans, R.M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, **57**, 1139-1146.
- Van de, S.A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A., Johnson, J.P. and van der Saag, P.T. (1994) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-ace. **269**, 6185-6192.
- Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Vermeulen, L., De Wilde, G. and Haegeman, G. (2002) Induction and repression of NF-kappa B-driven inflammatory genes. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 233-278.
- Wade, E.J., Heck, S. and Cato, A.C. (1995) Glucocorticoid receptor-activator protein-I interactions in drug design. *Biochem Soc Trans*, **23**, 946-952.
- Wang, Y. and Gilmore, T.D. (2001) LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochim Biophys Acta*, **1538**, 260-272.
- Wang, Y. and Gilmore, T.D. (2003a) Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim Biophys Acta*, **1593**, 115-120.
- Wang, Y. and Gilmore, T.D. (2003b) Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. **1593**, 115-120.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P. and Kîinig, H. (2001) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *Embo J*, **20**, 4194-4203.
- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Young, R.A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, **84**, 235-244.

- Wissink, S., van Heerde, E.C., Schmitz, M.L., Kalkhoven, E., van der Burg, B., Baeuerle, P.A. and van der Saag, P.T. (1997) Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, **272**, 22278-22284.
- Yamamoto, K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. **19**, 209-252.
- Yang, L., Guerrero, J., Hong, H., DeFranco, D.B. and Stallcup, M.R. (2000) Interaction of the tau2 transcriptional activation domain of glucocorticoid receptor with a novel steroid receptor coactivator, Hic-5, which localizes to both focal adhesions and the nuclear matrix. *Mol Biol Cell*, **11**, 2007-2018.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, **62**, 1205-1215.
- Yao, T.P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. and Livingston, D.M. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. **93**, 10626-10631.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. **44**, 67-108.
- Zhang, X.K., Wills, K.N., Husmann, M., Hermann, T. and Pfahl, M. (1991) Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol Cell Biol*, **11**, 6016-6025.
- Zilliacus, J., Wright, A.P., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.A. (1995) Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. **9**, 389-400.
- Zong, W.X., Bash, J. and Gelinas, C. (1998) Rel blocks both anti-Fas- and TNF alpha-induced apoptosis and an intact Rel transactivation domain is essential for this effect. **5**, 963-972.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AF-1, AF-2	Aktivierungsfunktion 1 und 2
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgen-Rezeptor
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
C'	Carboxy-Terminus
cDNA	copy DNA
CE	engl. <i>cytoplasmic extraxt</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
DBD	DNA-Bindedomäne
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
Dex	Dexamethason
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	engl. <i>enhanced chemofluorescence</i>
engl.	englisch
et al.	und andere (lateinisch et alii)
evtl.	eventuell
FHL	engl. <i>Four and a half Lim domain proein</i>
forw	engl. <i>forward</i>
FZK	Forschungszentrum Karlsruhe
GAPDH	Glycerinaldehyd-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	engl. <i>glucocorticoid responsive element</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	engl. <i>hinge region</i>
HAT	Histonazetylase

Abkürzungen

HDAC	Histondeazetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerretich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IκB	engl. <i>inhibitor of κB</i>
IL-8	Interleukin 8
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LBD	Ligandenbindedomäne
LPS	Lipopolysaccharid
LMO	engl. <i>Lim only protein</i>
mH12	Mutante Helix12
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
N'	Amino-Terminus
NE	engl. <i>nuclear extract</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NF-κB	engl. <i>nuclear factor κB</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PIC	engl. <i>protein inhibitor complex</i>
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RXR	Retinsäurerezeptor
rev	engl. <i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	eng. <i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	engl. <i>Tris buffered saline/ Tween</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer

Abkürzungen

TR	Thyroid-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRE	engl. <i>TPA responsive element</i>
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WCE	engl. <i>whole cell extract</i>
w/v	Masse pro Volumen, engl. <i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-Indoyl- β -Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
z.T	zum Teil

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leuzin
M	Met	Methionin
N	Apn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

Abkürzungen