

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

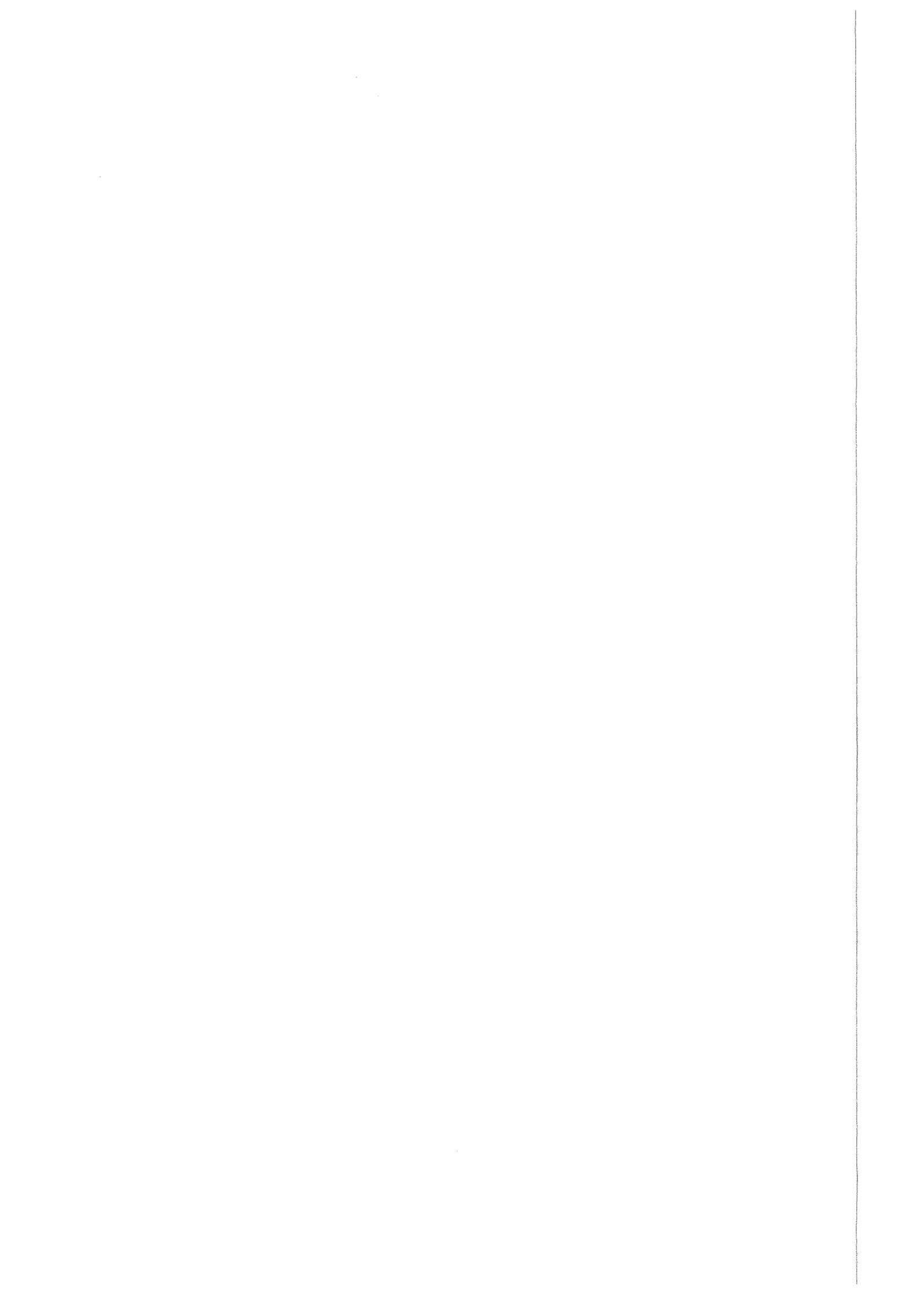
**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6296

**Regulation des T-Zellwachstums  
durch Glukokortikoide:  
Rolle des Zellzyklusinhibitors  
p27<sup>Kip1</sup> und des antiapoptotischen  
Faktors RAP46**

**M. Kullmann**  
Institut für Genetik

**April 1999**

---



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6296

Regulation des T-Zellwachstums durch  
Glukokortikoide:  
Rolle des Zellzyklusinhibitors p27<sup>Kip1</sup>  
und des antiapoptotischen Faktors RAP46

Michael Kullmann

Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1999

**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**

## Zusammenfassung

Durch ihre antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Wirkungen sind Glukokortikoide wichtige Bestandteile verschiedener therapeutischer Behandlungen. Da längerfristige Glukokortikoid-Therapien teilweise mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind, liegt ein Schwerpunkt der Hormonforschung auf der Entwicklung besserer Substanzen mit spezifischeren Eigenschaften. Um dies zu erreichen, muß man die molekularen Mechanismen der Glukokortikoid-Wirkungen genauer verstehen.

Glukokortikoide binden an den Glukokortikoidrezeptor (GR), der als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen aktiviert oder reprimiert. Die Expression einer Reihe von Genen, die bei Entzündungs- und Immunreaktionen beteiligt sind, wird durch Glukokortikoide negativ reguliert. Deshalb wird vermutet, daß die genreprimierende Funktion des GR (Transrepression) für die Entzündungshemmung und Immunsuppression verantwortlich ist, aber die ungünstigen Nebenwirkungen auf die genaktivierende Funktion des GR (Transaktivierung) zurückzuführen sind. Daher besteht die Hoffnung, durch ausschließlich genreprimierende Glukokortikoide, spezifischere physiologische Wirkungen zu erzielen und Nebenwirkungen zu vermeiden.

Zellzyklusblock und Apoptose von T-Zellen sind wichtige Mechanismen der immunsupprimierenden Wirkungen von Glukokortikoiden. Aber die molekularen Ursachen, die diesen Prozessen zugrunde liegen, sind noch nicht gut verstanden.

Daher wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der Beitrag von Genaktivierung und Genrepression bei der Glukokortikoid-induzierten Wachstumshemmung einer Thymomlinie untersucht.

Der Glukokortikoid-induzierte Block der Thymomlinie S49.1 in der G1-Phase des Zellzyklus korrelierte mit der Aktivierung des Retinoblastom-Genprodukts (Rb) und der deutlichen negativen Regulation der Expression von Zyklin D3 und der Zyklin-abhängigen Kinase 4 (cdk4). Zusätzlich wurde nach Glukokortikoid-Behandlung eine starke Induktion der Menge des cdk-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup>, verbunden mit einer vollständigen Hemmung der cdk2-Aktivität, gefunden.

Transkriptionelle und posttranslationelle Mechanismen sind an der Akkumulation von p27<sup>Kip1</sup>-Protein beteiligt. Die Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA könnte durch Aktivierung des Promotors erfolgen, in dem sich ein potentielles Glukokortikoid-reagierendes Element (GRE) befindet. Aber auch eine überlappende Sequenz für "CCAAT-Box"-bindende Transkriptionsfaktoren könnte die Glukokortikoid-Aktivierung vermitteln.

Die Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-Expression scheint durch die genaktivierende Funktion des GR zu erfolgen. Dies widerspricht der Annahme, daß alle immunsuppressiven Wirkungen von Glukokortikoiden auf Genrepression zurückzuführen sind.

Durch Verwendung einer GR-Mutante sollte daher der Beitrag von Transaktivierung und Transrepression beim Zellzyklusblock und der Apoptose bestimmt werden.

Die Experimente ergaben, daß weder der Wildtyp-GR noch die GR-Mutante in diesen Analysen einen Zellzyklusblock induzieren konnte, sodaß nicht klar wurde, ob Genaktivierung oder Genrepression beim Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblocks beteiligt sind.

Interessanterweise zeigten weitere Analysen, daß das apoptotische Programm durch die Expression von Wildtyp-GR und GR-Mutante rekonstituiert wird. Demnach sind unterschiedliche Mechanismen für den Zellzyklusblock und die Apoptose verantwortlich. Ferner wurde nochmals bestätigt, daß die genreprimierende Funktion des GR für die Induktion der Apoptose ausreicht, aber die Hemmung von AP-1-Aktivität allein keine Apoptose auslöst.

Daher sollten in Zukunft zusätzliche, negativ regulierte Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B, bei der Charakterisierung von neuen genreprimierenden Glukokortikoiden in die Untersuchungen einbezogen werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde RAP46 als negativer Regulator aller getesteten GR-Funktionen charakterisiert. RAP46-Expression in der Glukokortikoid-sensitiven Thymomlinie S49.1 führte zu einer vollständigen Inhibition der transkriptionellen und wachstumshemmenden Eigenschaften des GR. RAP46-Expression könnte demnach als Verursacher von Resistenzphänomenen bei Glukokortikoid-Therapien in Frage kommen.

# Regulation of T-cell growth by glucocorticoids: Role of the cell cycle inhibitor p27<sup>Kip1</sup> and the antiapoptotic factor RAP46

**Abstract:** Glucocorticoids are widely used therapeutically as antiinflammatory and immune-suppressive drugs. As long-term glucocorticoid therapies often lead to undesired side-effects, one of the main emphasis in research in this field is the development of specific drugs with reduced side-effects. To achieve this goal, it is important to get a better understanding in the molecular mechanisms of glucocorticoid effects.

Glucocorticoids bind to the glucocorticoid receptor (GR), which then either positively or negatively regulates the expression of genes. The expression of several genes involved in inflammatory or immune responses are negatively regulated by glucocorticoids. This led to the assumption that the negative regulatory function of the GR (transrepression) is responsible for antiinflammation and immune-suppression while the unfavourable side-effects are due to the positive regulatory function of the receptor (transactivation). It is therefore thought that glucocorticoids with transrepressive properties would be more specific for treatment since they would have less side-effects.

Cell cycle block and apoptosis of T-cells are both well known mechanisms of the immune-suppressive functions of glucocorticoids, but the underlying molecular events of these processes, are barely understood.

Therefore, in the first part of this work, the contribution of transactivation and transrepression by the GR to growth suppression of a thymoma cell line was investigated.

Glucocorticoid-induced arrest of the thymoma cell line S49.1 in the G1-phase of the cell cycle correlated with the activation of the retinoblastoma gene-product (Rb) and significant downregulation of cyclin D3 and cyclin dependent kinase 4 (cdk4) protein levels. In addition, upon glucocorticoid treatment, a strong upregulation of the amount of the cdk-inhibitor p27<sup>Kip1</sup> accompanying a complete inhibition of cdk2-activity was detected.

Transcriptional and posttranslational mechanisms are involved in the accumulation of p27<sup>Kip1</sup> protein. The induction of p27<sup>Kip1</sup>-mRNA could be due to the activation of the p27<sup>Kip1</sup>-promoter, which harbours a putative glucocorticoid response element (GRE). Alternatively an overlapping binding sequence for "CCAAT-box" binding transcription factors could also be responsible for the glucocorticoid activation.

The induction of p27<sup>Kip1</sup> expression seems to be caused by the transactivation function of the GR. This contradicts the assumption that the immune-suppressive effects of glucocorticoids are caused by transrepression.

With the use of a mutant GR, the role of transactivation and transrepression in cell cycle block and apoptosis was further investigated.

The experiments showed that neither the wild-type nor mutant GR was able to induce a cell cycle block. Thus the contribution of transactivation and transrepression to the glucocorticoid-induced cell cycle block were inconclusive.

Interestingly, the apoptotic program could be reconstituted by the expression of the wild-type and mutant GR, suggesting that two independent mechanisms lead to cell cycle block and apoptosis. The experiments further confirmed that the transrepression property of the GR, but not inhibition of AP-1-activity, is sufficient for the induction of apoptosis.

Thus future studies on the characterisation of new transrepressing glucocorticoids should include other negatively regulated transcription factors such as NF- $\kappa$ B.

In the last part of this work, RAP46 was characterised as a negative regulator of all GR-functions examined. Expression of RAP46 in glucocorticoid-sensitive thymoma S49.1-cells lead to a complete inhibition of transcriptional and growth-repressive properties of the GR. So RAP46-expression could serve as a cause for "resistance syndromes" in long-term glucocorticoid therapies.

# Inhalt

<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
Glukokortikoide und ihre Wirkungen auf Organismen.....	2
Glukokortikoide als Modulatoren der Genexpression.....	4
Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor .....	4
a. Positive Regulation der Genexpression.....	5
b. Repression der Genexpression .....	5
c. Aktivierung und Repression von Genen durch den Glukokortikoidrezeptor erfolgen durch voneinander unabhängige Mechanismen .....	8
Glukokortikoide sind entzündungshemmende und immunsupprimierende Substanzen.....	8
Proliferationshemmung und Apoptose sind Mechanismen der Immunsuppression durch Glukokortikoide .....	9
Der Zellzyklus höherer Organismen.....	9
Glukokortikoide regulieren die Menge von Zellzyklusproteinen des G1/S-Phasenübergangs.....	12
Regulation der T-Zellapoptose durch Glukokortikoide.....	12
Glukokortikoide induzieren Apoptose in Zellen des Immunsystems und lymphoiden Tumoren.....	13
Glukokortikoidinduzierte Apoptose: Induktion von Lysis- oder Repression von Überlebensgenen?.....	14
Regulation der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie.....	14

Das mit dem Glukokortikoid-Rezeptor interagierende RAP46 ist ein Homolog zum antiapoptotischen Protein BAG-1.....	15
Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>17</b>
Teil 1: Regulation des Zellzyklus und der Apoptose von T-Zellen durch Glukokortikoide.....	17
Dexamethasonbehandlung von S49.1-Zellen führt zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus ("G1-Block").....	17
Dexamethason aktiviert das Retinoblastom-Protein (Rb) .....	19
Die Menge der G1-Zellzyklusproteine Zyklin D3, cdk2 und cdk4 wird durch Dexamethason erniedrigt; die Menge an cyclin E bleibt konstant.....	19
Glukokortikoide induzieren die Menge des Inhibitors von Zyklin-abhängigen Kinasen p27 <sup>Kip1</sup> .....	21
Die zyklinabhängige Kinase cdk2 wird durch Dexamethason gehemmt .....	22
Die Halbwertszeit von p27 <sup>Kip1</sup> -Protein wird durch Dexamethason verlängert.....	24
Dexamethason hemmt die p70/p80 S6-Kinase, eine Komponente des PI3-Kinase-Signalwegs .....	26
Dexamethason induziert p27 <sup>Kip1</sup> -mRNA .....	28
Dexamethason aktiviert den p27 <sup>Kip1</sup> -Promotor .....	29
Der Bereich von -600 bis -395 im p27 <sup>Kip1</sup> -Promotor vermittelt Hormoninduzierbarkeit.....	31
Zerstörung des hormonreagierenden Elements im p27 <sup>Kip1</sup> -Promotor verringert die Induzierbarkeit durch Dexamethason .....	32

Welche Funktionen des Glukokortikoidrezeptors sind für den Zellzyklusblock verantwortlich.....	33
Transaktivierung und Transrepression durch die Glukokortikoidrezeptor-Mutante LS7 in S49.1G3.R1 .....	35
Keine Rekonstitution des Zellzyklusblocks in Wildtyp-GR und LS7-Mutante exprimierenden S49.1G3.R1.....	39
Kein Einfluß von Glukokortikoiden auf die Expression von Zellzyklusfaktoren in den rekonstituierten S49.1G3.R1-Zellen .....	41
Charakterisierung der Glukokortikoid-induzierten Apoptose in den Thymom-Zelllinien S49.1 und S49.1G3.R1.....	42
Die genreprimierenden Eigenschaften des Glukokortikoidrezeptors sind ausreichend für die Apoptose in S49.1G3.R1 .....	45
 Teil 2: RAP46 als negativer Regulator von Glukokortikoidrezeptor-Funktionen .....	 48
 RAP46-Expression in S49.1-Zellen.....	 48
RAP46-Expression hemmt Transaktivierung und Transrepression durch den aktivierten Glukokortikoidrezeptor.....	50
RAP46-Expression in S49.1-Zellen verhindert Apoptose und Zellzyklusblock durch Glukokortikoide .....	52
Rapamycin verringert die Expression von BAG-1 und RAP46.....	54
Rapamycin verstärkt Transaktivierung und Apoptose durch Glukokortikoide.....	55
RAP46-exprimierende Klone sind auch bei gleichzeitiger Rapamycinbehandlung resistent gegen Glukokortikoide.....	57

**Diskussion ..... 59**

Teil 1: Beitrag von Transaktivierung und Transrepression  
bei dem Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock  
und der Apoptose von T-Zellen.....59

Die Rolle von p27<sup>Kip1</sup> bei der Proliferationshemmung durch Glukokortikoide..... 60

Regulation von Zellzyklusproteinen durch Glukokortikoide in S49.1-Zellen ..... 60

Zwei Mechanismen der Induktion von p27<sup>Kip1</sup>: Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein  
und Aktivierung der Transkription..... 61

Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein durch Glukokortikoide ..... 62

Aktivierung der p27<sup>Kip1</sup>-Transkription durch Glukokortikoide..... 64

Rolle von Transaktivierung und Transrepression beim Glukokortikoid-  
induzierten Zellzyklusblock..... 66

Unabhängigkeit von Glukokortikoid-induziertem Zellzyklusblock und Apoptose..... 67

Rolle von Transaktivierung und Transrepression bei der Glukokortikoid-  
induzierten Apoptose von T-Lymphomen ..... 68

Glukokortikoid-induzierte Apoptose von Thymozyten..... 70

Teil 2: BAG-1/RAP46 als negative Regulatoren  
der Glukokotikoidrezeptor-Funktion .....71

Mögliche physiologische Rolle von BAG-1/RAP46 ..... 71

**Material ..... 73**

Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien ..... 73

Induktoren und Inhibitoren ..... 75

Geräte und Verbrauchsmaterial ..... 75

Enzyme ..... 76

Radiochemikalien ..... 76

Antikörper ..... 76

Nährmedien für die Bakterienkultur ..... 77

Lösungen und Puffer ..... 77

Bakterienstämme ..... 77

Zelllinien ..... 77

Oligonukleotide ..... 78

Oligonukleotid zur Mutagenisierung ..... 78

Plasmid-DNAs ..... 78

**Methoden ..... 80**

Arbeiten mit Nucleinsäuren ..... 80

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nucleinsäuren ..... 80

Nucleinsäure-Fällung ..... 80

Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	80
Präparation größerer Plasmid-DNA-Mengen durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie ("Maxi-Präp").....	81
Präparation kleinerer Plasmid-DNA-Mengen ("Mini-Präp").....	81
Restriktionsverdau von DNA .....	82
Auffüllen von 5'-Überhängen .....	82
Ligation von DNA-Fragmenten.....	82
Punktgerichtete Mutagenisierung.....	82
Herstellung kompetenter Bakterien von <i>E. coli</i> .....	83
Transformation kompetenter Bakterien .....	83
Agarose-Gelelektrophorese .....	84
Isolierung von DNA-Fragmenten .....	84
Poly (A) <sup>+</sup> mRNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen ( <i>Aviv und Leder, 1972; Rahmsdorf et al., 1986</i> ) .....	85
Auftrennung von RNA im Agarosegel.....	85
<i>Northern blot</i> : Transfer von RNA auf Nylonmembran .....	86
Nachweis spezifischer RNA mit <sup>32</sup> P-markierten cDNA-Proben ( <i>Denhardt, 1966; Alwine et al., 1977</i> ) .....	86
Herstellung von [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen.....	87
Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription.....	88

Amplifikation der Erststrang-cDNA mittels PCR.....	88
Arbeiten mit Proteinen.....	88
Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten.....	88
Präparation von Zytoplasmaextrakten (modifiziert nach <i>Koong et al.</i> , 1994).....	88
Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Lowry et al. (1951).....	89
Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	89
<i>Western Blot</i> : Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern (Immunoblot-Analyse) .....	90
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteingelen.....	90
Reportergen-Analysen.....	91
Untersuchung der Genexpression durch Chloramphenicol-Acetyltransferase- Aktivitäts-Messung ("CAT-Assay", <i>Gorman et al.</i> , 1982).....	91
Untersuchung der Genexpression durch Luziferase-Aktivitäts- Messung ( <i>Nguyen et al.</i> , 1988; <i>Brasier et al.</i> , 1989) .....	92
Zellkultur .....	92
Passagieren von Zellen .....	92
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	93
Behandlung von Zellen mit Induktoren.....	93
Einbringen von DNA in Zellen.....	93
Transiente und stabile Transfektion von Zellen mit DEAE-Dextran (1987) .....	93

Transiente und stabile Transfektion mit Kalziumphosphat ( <i>Graham und van der Eb</i> , 1973).....	94
Retrovirale Infektion von S49.1G3.R1 mit Hilfe des OmegaE-Systems ( <i>Morgenstern und Land</i> , 1990).....	94
Apoptose-und Zellzyklus-Bestimmungen.....	95
Detektion apoptotischer Zellen durch Annexin V-Bindung ( <i>Martin et al.</i> , 1995).....	95
Isolierung von DNA-Fragmenten ( <i>Herrmann et al.</i> , 1994) .....	95
Analyse der Zellzyklusverteilung von Zellen mittels Propidiumjodid, .....	96
Bestimmung apoptotischer "sub G0/G1"-Zellen ( <i>Telford et al.</i> , 1992).....	96
Cdk2-Aktivitätsmessung (" Kinase-Assay ", <i>Matsushima et al.</i> , 1994).....	96
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>98</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>100</b>

## **Einleitung**

Die Regulation des Wachstums von Zellen ist ein essentieller Vorgang bei der Entwicklung und Homöostase vielzelliger Organismen. Diese Prozesse werden durch endogene Faktoren, wie Hormonen, gesteuert, aber auch exogene Einflüsse, wie UV-Licht, radioaktive Strahlung oder Temperatur wirken auf Zellen mit zum Teil nachteiligen Folgen. Das Schicksal einer Zelle wird durch drei physiologische Mechanismen bestimmt: Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Diesen Prozessen unterliegen genetische Programme, deren Abläufe, zumindest in ihren Grundzügen, von einfachen bis höheren Organismen konserviert sind. Die negative Kontrolle der Proliferation ist essentiell, um verstärktes Wachstum (Hyperplasie) und als Folge neoplastische Transformation von Zellen zu verhindern. Umgekehrt ist auch die Stimulation des Wachstums physiologisch sinnvoll, um z.B. bei der Wundheilung die Proliferation von Fibroblasten anzuregen.

Bei der Eliminierung von krebsartigen Zellen durch Immunzellen spielen apoptotische Vorgänge eine entscheidende Rolle; ebenso ist die Beseitigung von Zellen durch Apoptose ein wichtiger Vorgang bei der Entwicklung von Organismen, wie der Gliedmaßenbildung oder der Reifung des Immunsystems (Jacobson et al., 1997).

In höheren Organismen haben sich komplexe Mechanismen entwickelt, die es dem Organismus ermöglichen, durch äußere Einflüsse (exogene Faktoren) und/oder Veränderungen innerhalb des Organismus (z.B. Entzündungsreaktionen, endogene Faktoren) bedingte pathologische Situationen zu vermeiden oder zu reparieren. Ein solches, streng kontrolliertes System, ist das Hormonsystem. Es besteht aus Zellen bzw. Zellverbänden (Drüsen), die wirksame Substanzen (Hormone) produzieren und in das Blutsystem sezernieren, über das die Hormone ihr Zielgewebe erreichen und dort durch Bindung an spezifische Rezeptoren eine physiologische Antwort auslösen. Die Hormone höherer Organismen werden verschiedenen molekularen Gruppen zugeteilt; man unterscheidet Amine, Prostaglandine, Polypeptide, Proteine und Steroide (Baulieu und Kelly, 1990). Bei der letzteren Gruppe handelt es sich um zyklische Kohlenstoffderivate, die alle aus der Steroidvorstufe Cholesterin synthetisiert werden. Die Steroide haben eine wichtige Aufgabe bei verschiedensten physiologischen Prozessen. So beeinflussen sie den Metabolismus, die Morphogenese und auch das Verhalten von Organismen.

Die Steroide selbst werden außerdem in funktionelle Gruppen unterteilt: Sexsteroiden, zu denen Progesteron, Östrogen und Testosteron gehören, sie sind wichtig für die Entwicklung des embryonalen reproduktiven Systems, das Fortpflanzungsverhalten erwachsener Tiere und die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale; Vitamin D<sub>3</sub>, das an der Knochenentwicklung und -differenzierung beteiligt ist und schließlich die Nebennierenhormone Cortisol und Aldosteron, welche die Körperhomöostase von Organismen durch Kontrolle des Glykogen- und Mineralstoffwechsels regulieren, Einfluß auf das Immun- und Nervensystem

nehmen, sowie das Wachstum und die Differenzierung von Zellen kontrollieren (Baulieu und Kelly, 1990).

## **Glukokortikoide und ihre Wirkungen auf Organismen**

Von den Nebennierenhormonen haben besonders die Glukokortikoide einen starken Einfluß auf die Physiologie eines Organismus. Die Bedeutung der Glukokortikoide wird deutlich bei der Ausbildung von Krankheiten durch zu hohe bzw. zu geringe Hormonspiegel im Blut. Die Konzentration von Glukokortikoidhormon im Blut wird durch die Aktivität der Nebennierenrinde reguliert. In der "zona fasciculata" der Nebennierenrinde erfolgt die Biosynthese des Hauptglukokortikoids Cortisol aus der Vorstufe Cholesterol. Disregulation der Glukokortikoidmengen im Blut können zu pathologischen Veränderungen führen. So kann durch Zerstörung der Nebenniere, wie sie bei bestimmten Autoimmunkrankheiten vorkommt, zu geringe Adrenokortikoidkonzentrationen zur Folge haben (z.B. "Addison Syndrom" <-> chronische adrenokortikoide Insuffizienz). Überfunktion der Hypophyse mit überhöhtem ACTH-(Adrenokortikotropes Hormon)-Spiegel stimuliert dagegen die Nebennierenfunktion, welches eine erhöhte Glukokortikoidkonzentration induziert. Diese allgemein als "Cushing Syndrom" bezeichnete pathologische Situation tritt auch als Nebenwirkung verschiedener Glukokortikoidtherapien auf. Die Entstehung dieser Krankheit soll durch die Entwicklung neuer Substanzen, ohne ungünstiger Nebenwirkungen, vermieden werden und ist Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung (Vayssiere et al., 1997).

Die energiemobilisierende Wirkung von Glukokortikoiden wird durch die positive Wirkung auf die Biosynthese von an der Glukoneogenese beteiligten Enzymen der Leber verursacht (Tabelle 1). Die Stimulation der Glukoneogenese führt zu einer Hyperglykämie und damit zur Verfügbarkeit schneller Energie bei Hunger und anderen Streßreaktionen. Neben der positiven Wirkung auf Funktionen der Leber, haben Glukokortikoide auch einen negativen Einfluß auf das Immunsystem höherer Organismen. Besonders sensitiv auf Glukokortikoide reagieren Thymozyten, T-Lymphozyten und T-Lymphome. Diese Eigenschaft führte zur verbreiteten medizinischen Anwendung von Glukokortikoiden als immunsupprimierende und entzündungshemmende Substanzen. So werden Glukokortikoide seit etwa Mitte dieses Jahrhunderts bei der Therapie von rheumatoider Arthritis, lymphatischen Leukämien und Lymphomen angewendet (Hench, 1949; Boumpas et al., 1991; Karin und Saatcioglu, 1997). Als Ursache der vorteilhaften Effekte von Glukokortikoiden gelten unter anderem negative Einflüsse auf die Expression und Ausschüttung der Mediatoren von Entzündungsreaktionen (Zytokine wie IL-2, IL-4 oder IL-6, Tabelle 1) und

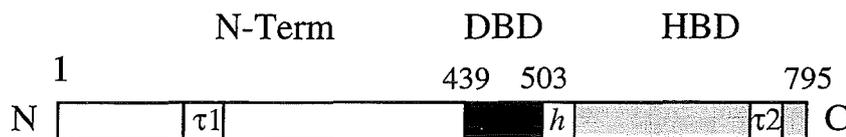
Gene	Glukokortikoid-regulation	physiologischer Prozess	Referenz
<b>Enzyme</b>			
Tryptophanoxygenase	positiv	Glukoneogenese	Lucas und Granner, 1992
PEP-Carboxykinase	positiv	Glukoneogenese	Lucas und Granner, 1992
Tyrosiaminotransferase	positiv	Glukoneogenese	Lucas und Granner, 1992
Kollagenase I	negativ	Entzündung	Jonat et al., 1990
IκBα	positiv	Entzündung/Immunreaktion	Heck et al., 1997
<b>Adhäsionsmoleküle</b>			
ICAM 1	negativ	Entzündung/Immunreaktion	Caldenhoven et al., 1995
E-Selectin	negativ		Cronstein et al., 1992
<b>Zytokine</b>			
IL-2	negativ	Entzündung/Immunreaktion	Vacca et al., 1992
IL-6	negativ		Stein und Young, 1995
<b>Zellzyklusfaktoren</b>			
cyc D3	negativ	Proliferation	King und Cidlowski, 1998
cdk4	negativ	Proliferation	King und Cidlowski, 1998

**Tabelle 1: Auflistung von Glukokortikoid-regulierten Genen und davon betroffene physiologische Prozesse.** Für alle angegebenen Gene ist zumindest eine transkriptionelle Kontrolle durch Glukokortikoide beschrieben; die Effekte auf die Genexpression korrelieren mit Effekten auf die angegebenen physiologischen Prozesse. PEP-Carboxykinase: Phosphoenolpyruvatcarboxykinase; IκBα: Inhibitorprotein des Transkriptionsfaktors NF-κB; ICAM 1: "Intracellular cell adhesion molecule 1"; IL-2: Interleukin 2; IL-6: Interleukin 6; cyc D3: "cyclin D3"; cdk4: "cyclin dependent kinase 4".

deren Oberflächenrezeptoren, Wachstumseffekte durch Proliferationshemmung (Zellzyklusblock, zytostatischer Effekt) und das Abtöten von Zellen (Apoptose, zytolytischer Effekt). Man nimmt dabei an, daß die Proliferationshemmung durch die negative Regulation spezifischer Gene, wie Zyklin D3 (cyc D3) oder der Zyklin-abhängigen Kinase 4 (cdk4), erfolgt und daß wahrscheinlich alle physiologischen Effekte von Glukokortikoiden auf der Ebene der Genexpression erfolgen (King und Cidlowski, 1998).

## Glukokortikoide als Modulatoren der Genexpression

Glukokortikoide regulieren die Genexpression sowohl positiv als auch negativ. Dies geschieht, indem das Hormon zunächst durch passive Diffusion in die Zelle eindringt, wo es an ein zytoplasmatisches Protein, den Glukokortikoidrezeptor (GR) bindet. Der hormonegebundene Rezeptor macht dadurch eine Konformationsänderung durch, die ihn von inhibitorischen Molekülen befreit und die Translokation in den Zellkern erlaubt. Dort ist der aktivierte (transformierte) GR in der Lage die Genexpression positiv oder negativ zu modulieren. Der GR hat eine modulare Struktur, d.h. bestimmten Bereichen des Proteins kann man spezifische Funktionen zuordnen (Abb. 1). So besteht der Glukokortikoidrezeptor aus drei Hauptdomänen, einem aminoterminalen Bereich, mit einer ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion (Transaktivierungsdomäne, AF-1 oder  $\tau 1$ ), einer zentralen Domäne, die für DNA-Bindung und Dimerisierung zweier Rezeptoren (Homodimerisierung) notwendig ist und einem carboxyterminalen Bereich, wo die Hormonbindung stattfindet und sich eine zweite, hormonabhängige Transaktivierungsfunktion (AF-2 oder  $\tau 2$ ) in der Liganden-bindenden Domäne befindet.



**Abb. 1: Struktur von ligandenaktivierbaren Rezeptoren am Beispiel des Ratten-Glukokortikoidrezeptors (GR).** N: Aminoterminales Ende, C: carboxyterminales Ende; N-Term: Aminoterminaler Bereich mit  $\tau 1$ : ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion 1; DBD: DNA-bindende und Homodimerisierungsdomäne; HBD: Hormonbindender Bereich mit Ligandenbindung und  $\tau 2$ : ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion 2; *h*: "hinge region"

## Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor

Nach einem heute allgemein anerkannten Modell führt die Bindung von Hormon an den Glukokortikoidrezeptor (GR) zu einer Konformationsänderung. Die hormoninduzierte Transformation des GR zu einem transkriptionell aktiven (aktivierten) Rezeptor erfolgt zunächst durch die Dissoziation des Rezeptors von inhibitorischen Proteinen wie die Hitzeschockproteine 90 und 70, die den Rezeptor im hormonungebundenen Zustand im Zytoplasma zurückhalten. Nach Dissoziation kann der Rezeptor in der nun vorliegenden Konformation in den Zellkern translozieren und die Expression von Genen entweder positiv oder negativ beeinflussen (Abb. 2).

### **a. Positive Regulation der Genexpression**

Für die positive Regulation der Genexpression muß der hormonegebundene Glukokortikoidrezeptor (GR) an spezifische DNA-Elemente in den Promotoren der Zielgene binden.

Die Klonierung der Promotoren verschiedener Glukokortikoid-induzierbarer Gene, z.B. der Promotorregion des MMTV-(Maus-Mamma-Tumorvirus)-Genoms, führte zur Identifikation von Sequenzelementen, sog. GREs (Glukokortikoid-reagierende Elemente), die für die Hormoninduktion verantwortlich sind. Ein Vergleich der verschiedenen Sequenzmotive ließ eine 15 bp Konsensussequenz erkennen, die Bindung und Aktivierung (Transaktivierung) von Genen durch den GR vermittelt. Dabei ist die 6 bp große rechte Halbseite mit der Sequenz T G T T/C C T in allen GREs stark konserviert (Lucas und Granner, 1992), im Gegensatz zur linken Halbseite, die stark zwischen den verschiedenen GREs variiert. In Glukokortikoid-aktivierbaren Promotoren finden sich oft weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die in Wechselwirkung mit den GREs, für die maximale Aktivierung der Promotoren notwendig sind. Man spricht deshalb manchmal von sog. Glukokortikoid-reagierenden Einheiten ("Glucocorticoid response unit", GRU; Lucas und Granner, 1992).

Bis vor kurzem war noch nicht klar, wie der an DNA gebundene GR die Transkription von Genen aktiviert. Es wurde zunächst angenommen, daß die Transaktivierung des GR durch Wechselwirkung der Aktivierungsdomänen mit Komponenten des Transkription-Initiationskomplexes erfolgt. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß der GR für seine volle transkriptionelle Aktivität, die Interaktion mit sog. Koaktivatoren benötigt. Dabei scheint der Rezeptor in einem Komplex mit mehreren Faktoren vorzuliegen, von denen einige zum Teil enzymatische Aktivität besitzen, die zur transkriptionsfördernden Veränderung der Chromatinstruktur beitragen (Histonazetyltransferase-(HAT)-Funktion, Abb. 2, Torchia et al., 1998). Die Aufgabe von HATs scheint die Modifikation der Chromatinstruktur durch Azetylierung des Histonanteils zu sein. Die dadurch induzierte Öffnung des Chromatins macht die betroffenen Promotoren zugänglicher für Transkriptionsfaktoren und steigert somit die Transkription von Genen (Struhl und Moqtaderi, 1998).

### **b. Repression der Genexpression**

Zusätzlich zu seiner positiven Wirkung kann der GR die Expression von Genen negativ regulieren

(Sakai et al., 1988; Lucibello et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Schüle et al., 1990; Diamond et al., 1990). Die negative Regulation der Genexpression durch den aktivierten Glukokortikoidrezeptor (GR) kann prinzipiell durch zwei Mechanismen erfolgen: einmal durch Bindung an Promotorelemente, sog. nGREs (negative Glukokortikoid-reagierende Elemente), die sich deutlich von klassischen GREs unterscheiden und wo der Rezeptor, an DNA gebunden, die Genexpression hemmt. Ein zusätzlicher Mechanismus erfolgt ohne an DNA zu binden, durch Protein-Protein-Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität

## *Einleitung*

dadurch gehemmt wird (negative transkriptionelle Interferenz; Cato und Wade, 1996; Karin, 1998; Göttlicher et al., 1998; Abb. 2). Im ersten Fall scheint der aktivierte GR die Transkription zu inhibieren, indem er einen konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktor von der DNA verdrängt. Obwohl einige Gene mit nGREs im Promotorbereich gefunden wurden, läßt sich keine Konsensussequenz für nGREs aufstellen, sodaß bisher ein einheitlicher Mechanismus nicht ersichtlich ist. Der zweite Mechanismus, die transkriptionelle Interferenz, wurde für die negative Regulation verschiedener Gene durch den aktivierten GR vorgeschlagen. Dabei soll der Rezeptor, ohne daß er an DNA bindet, durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1, deren transkriptionelle Aktivität hemmen. Die gegenwärtigen Vorstellungen zum Mechanismus der negativen Regulation von AP-1-Aktivität durch Glukokortikoide basieren auf Untersuchungen des in diesem Zusammenhang am besten erforschten menschlichen Kollagenase I-Gens. In diesem Fall erfolgt die Repression der Kollagenase-Expression in Abwesenheit von Proteinbiosynthese, durch negative Interferenz mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Jonat et al., 1990). Während der Repression wird AP-1 nicht durch den GR vom Promotor verdrängt (König et al., 1992) und wahrscheinlich sind monomere Rezeptormoleküle für die Repression von AP-1 verantwortlich (Heck et al., 1994). Ob der Rezeptor dabei direkt mit AP-1 interagiert (Abb. 2 I) oder ob weitere Faktoren eine Brückenfunktion zwischen beiden Transkriptionsfaktoren ausüben (Abb. 2 II), ist noch nicht geklärt. Aber die Tatsache, daß die Interaktion von AP-1 mit dem GR nicht ausreichend für die Repression der AP-1-Aktivität ist (Göttlicher et al., 1996), macht die Beteiligung weiterer Proteine an der GR/AP-1-Interferenz wahrscheinlich. Nach solchen Korepressoren, die mit dem GR und AP-1 einen transkriptionell inaktiven Komplex ausbilden könnten (Abb. 2 II), wird daher momentan intensiv gesucht. Ein weiterer Mechanismus, wie der aktivierte GR AP-1-Aktivität hemmen könnte, ist Konkurrenz um einen gemeinsamen Koaktivator (Abb. 2 III). Dieser Mechanismus wird durch Experimente unterstützt, die eine Konkurrenz von AP-1 und GR um den gemeinsamen Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein) zeigten (Kamei et al., 1996).

Einleitung

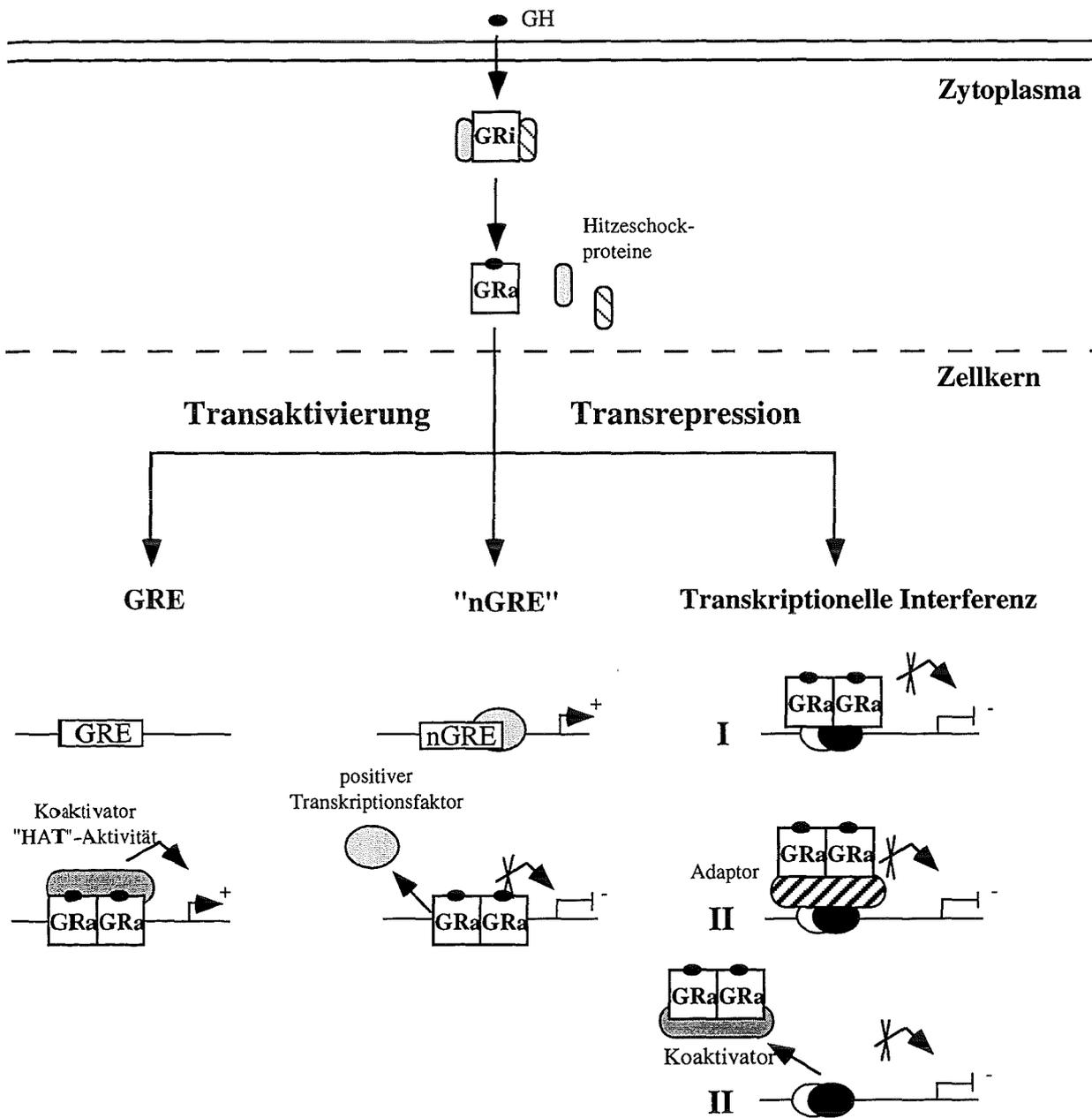


Abb 2: Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors und verschiedene Modelle zur positiven und negativen Regulation der Genexpression durch den GR. GRI: inaktiver, zytoplasmatischer GR; GRa: hormonaktivierter (aktivierter) GR; zur Vereinfachung sind nur drei Modelle der transkriptionellen Interferenz angegeben: I: direkte Protein-Protein-Interaktion, II: indirekte Protein-Protein-Interaktion über zusätzlichen Faktor, III: Konkurrenz um gemeinsamen Koaktivator; Erklärungen im Text.

### **c. Aktivierung und Repression von Genen durch den Glukokortikoidrezeptor erfolgen durch voneinander unabhängige Mechanismen**

Genexpressions-Analysen mit Glukokortikoidrezeptor-(GR)-Mutanten und Glukokortikoid-Analoga zeigten, daß Aktivierung (Transaktivierung) und Repression (Transrepression) von Genen durch den aktivierten GR zwei voneinander unabhängige Funktionen sind. So hemmen Rezeptormutanten mit stark eingeschränktem Transaktivierungspotential, sog. DNA-Bindungs oder Dimerisierungs-Mutanten, die Genexpression genauso gut wie Wildtyprezeptoren. Diese Ergebnisse wurden sowohl für die Repression der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, als auch von NF- $\kappa$ B gefunden (Heck et al., 1994; Heck et al., 1997).

Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B sind homo- oder heterodimere Komplexe, die sich aus Faktoren der AP-1- bzw. NF- $\kappa$ B-/Rel-Familie zusammensetzen (Angel und Karin, 1991; Angel 1994; Wulczyn et al., 1996). Viele Gene, die bei entzündlichen Prozessen und immunologischen Reaktionen verstärkt exprimiert sind, werden durch AP-1- und/oder NF- $\kappa$ B-Aktivität positiv und durch Glukokortikoide negativ reguliert (Wulczyn et al., 1996). Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Substanzen, die nur die transreprimierenden Eigenschaften von Glukokortikoiden haben (Vayssiere, 1997). Man hat dabei die Hoffnung, daß die gewünschten Effekte bei Glukokortikoidtherapien wie Immunsuppression oder Entzündungshemmung erhalten bleiben, aber unerwünschte Nebenwirkungen wie das "Cushing-Syndrom" ausbleiben oder zumindest milder verlaufen.

### **Glukokortikoide sind entzündungshemmende und immunsupprimierende Substanzen**

Glukokortikoide und ihre synthetischen Derivate werden aufgrund ihrer biologischen Wirksamkeit bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten verwendet. Dazu sind besonders die entzündungshemmenden und immunsupprimierenden Eigenschaften bei der Förderung von Wundheilungsprozessen und der Behandlung von rheumatoider Arthritis von Bedeutung. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Glukokortikoidwirkungen ist ihr negativer Einfluß auf das Wachstum von lymphoiden Tumoren, weshalb Glukokortikoide oft Bestandteil von Chemotherapien sind (DeVita et al., 1987; Coleman, 1992).

Die entzündungshemmenden Eigenschaften von Glukokortikoiden erfolgen auf allen Ebenen der entzündlichen Reaktionen (Tabelle 1). Eine entzündliche Reaktion wird typischerweise durch Beschädigung der Zellmembran initiiert; dies aktiviert Phospholipasen, welche die Prozessierung von Arachidonsäure katalysieren. Die Freisetzung von Arachidonsäure wiederum aktiviert weitere Enzyme, die zur Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen (Cyklooxygenasen, Lipoxygenasen) führen. Diese Substanzen sind wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion, da sie die Blutgefäße erweitern und die Blutzufuhr zur gereizten Stelle erhöhen, wodurch die Infiltration von Abwehrzellen (Immun- und Nichtimmunzellen) erleichtert wird. Die Infiltration hängt zusätzlich zur Blutgefäßerweiterung von der Expression von Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen ab, die durch Mitogene und Zytokine positiv reguliert

werden. Die entzündungshemmenden Glukokortikoidwirkungen könnten dabei auf der Hemmung der Expression der Cyklooxygenase, verschiedener Adhäsionsmoleküle und Zytokine beruhen (Cato und Wade 1996; Tabelle 1). Am wichtigsten für die immunsupprimierenden Eigenschaften von Glukokortikoiden scheint dabei der negative Einfluß auf die Expression und Ausschüttung von Zytokinen zu sein.

## **Proliferationshemmung und Apoptose sind Mechanismen der Immunsuppression durch Glukokortikoide**

Glukokortikoide hemmen das Wachstum durch eine Vielzahl von Einflüssen auf die Aktivität von wachstumsfördernden Molekülen. Dabei wird die Proliferation besonders effektiv durch die direkte Regulation von Zellzyklusproteinen gehemmt. Bevor auf die Glukokortikoid-Regulation von Zellzyklusfaktoren eingegangen wird, soll zunächst ein allgemeiner Überblick über den Zellzyklus und seinen Regulationsmöglichkeiten gegeben werden.

### **Der Zellzyklus höherer Organismen**

Zellen höherer Organismen durchlaufen während der Proliferation vier verschiedene Phasen des Zellzyklus: Die G1-Phase ("gap"-Phase 1), in der sich die Zellen auf die DNA-Synthese-(S)-Phase vorbereiten. Nach der S-Phase, in der sich die DNA-Menge verdoppelt hat, folgt eine G2-("gap" 2)-Phase, an die sich die M-(Mitose)-Phase anschließt, in der die verdoppelte DNA-Menge durch Trennung der Tochterchromosomen wieder gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt wird (siehe Abb. 3). In jeder Phase muß die Zelle enzymatische und strukturelle Voraussetzungen schaffen, die den Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus ermöglicht.

Die Grundkomponenten des Zellzyklus sind Zyklin-abhängige Kinasen ("cyclin-dependent kinases"; Abk. cdks) und deren regulatorische Untereinheiten, die Zykline ("cyclins"; Abk. cyps). Aktive Kinasekomplexe bestehen aus einer Kinase- und Zyklinuntereinheit. Diese Komplexe phosphorylieren ihre Substrate, wobei die Phosphorylierung, je nach Art des Substrats, aktivierend oder inaktivierend wirkt. Die Aktivität bestimmter cdk/cyc-Komplexe ist spezifisch für die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, z.B. cdk4, cdk6 assoziieren mit cyc D<sub>1</sub>/- D<sub>2</sub>/- D<sub>3</sub> und cdk2 mit cyc E in der G1-Phase und cdk2 assoziiert mit cyc A zu Beginn und während der S-Phase. (Nasmyth, 1996; Abb. 3).

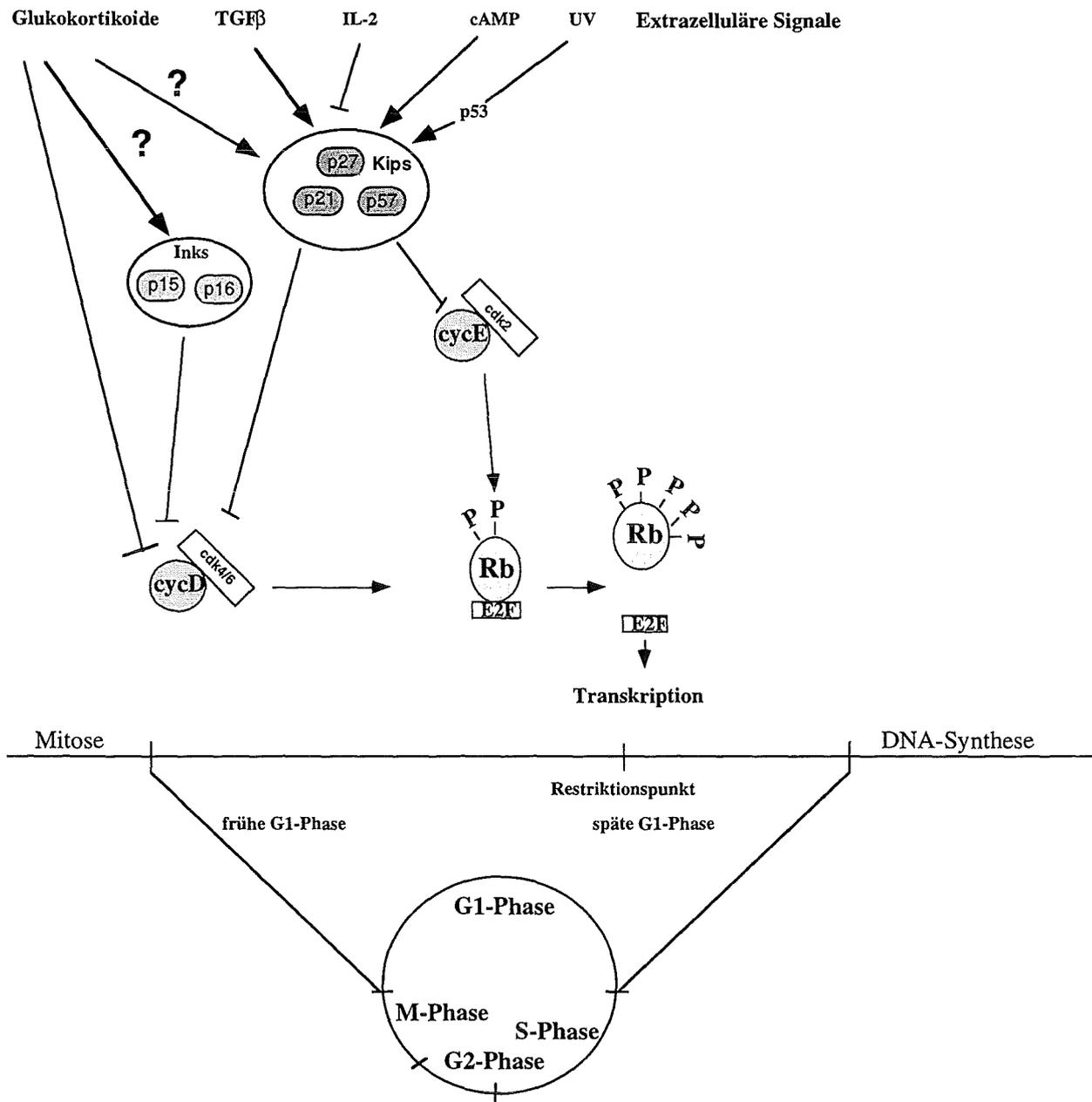
Die Komponenten des Zellzyklus werden durch unterschiedliche Mechanismen reguliert; einmal kann die Menge variieren, wie es für die Zykline bekannt ist. So steigt die Menge von cyc E mit Fortschreiten der G1-Phase stark an, um zu Beginn der S-Phase wieder abzufallen und die cyc B-Menge nimmt bis zu Beginn der Mitose zu und fällt während dieser wieder ab. Als Ursachen für die Schwankungen der Proteinmengen konnten für cyc E eine Steigerung seiner Transkription und für cyc B Destabilisierung des Proteins gezeigt werden (zur Übersicht: Sherr 1994; King et al., 1996). Im Gegensatz dazu variieren die cdk-Mengen im allgemeinen nicht stark während des Zellzyklus, ihre Aktivität wird durch Bindung an Zykline und ihren Phosphorylierungsstatus reguliert, wobei cdks sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert

## Einleitung

werden müssen, um katalytisch aktiv zu sein (Sherr, 1994). Eine weitere Regulation der katalytischen Aktivität von *cyc/cdk*-Komplexen erfolgt durch Assoziation mit kleinen Proteinen, die als *cdk*-Inhibitoren (*cdkIs*) bezeichnet werden. Aufgrund von Sequenzhomologien werden diese Inhibitoren in die *Ink4*-("inhibitor of kinase 4") und *Kip*-("kinase inhibitor protein")-Familien eingeteilt (zur Übersicht: Harper und Elledge, 1996). Zur *Ink*-Familie gehören *p15*, *p16*, *p18* und *p19* und zur *Cip/Kip*-Familie *p21*, *p27* und *p57*, wobei die Zahlen die ungefähren Molekulargewichte angeben. Die *Ink*-Familienmitglieder verhindern entweder die Bildung eines katalytisch aktiven *cyc/cdk*-Komplexes oder destabilisieren und zerstören diesen; dabei hemmen sie spezifisch die Aktivitäten von *cdk4* und *cdk6*. Die *cdk*-Inhibitoren der *Cip/Kip*-Familie üben im Gegensatz zur *Ink*-Familie ihre inhibitorische Wirkung als Bestandteil des *cyc/cdk*-Komplex aus. Es scheint so zu sein, daß sich *Kip*-Proteine schon als Adaptormoleküle in katalytisch aktiven *cyc/cdk*-Komplexen befinden und erst ein erhöhter Anteil von Inhibitor im Komplex zur Hemmung der *cdk*-Aktivität führt (Reynisdottir und Massague, 1997; LaBaer et al., 1997). Die Proteine der *Cip/Kip*-Familie sind nicht spezifisch für bestimmte *cyc/cdk*-Komplexe, obwohl sie unterschiedliche Affinitäten zu bekannten *cyc/cdk*-Komplexen haben. Über die Menge der *cdk*-Inhibitoren kann demnach effizient die Aktivität von *cdks* und damit der Übergang von der *G1*- in die *S*-Phase des Zellzyklus reguliert werden.

Der Verlauf der *G1*-Phase ist durch die sequentielle Aktivierung von *cdks* gekennzeichnet. In einer frühen Phase von *G1* sind die *cyc D/cdk4/6*-Komplexe aktiv, deren Funktion im weiteren Verlauf der *G1*-Phase vom *cycE/cdk2*-Komplex übernommen wird. Die für die Progression durch die *G1*-Phase entscheidenden Substrate der *cdks* sind das Retinoblastomgenprodukt *Rb* bzw. *Rb*-Homologe (zur Übersicht: Weinberg, 1995). Die mehrfache Phosphorylierung von *Rb* ist Voraussetzung für den Übergang in die *S*-Phase des Zellzyklus. Hypophosphoryliertes *Rb* liegt zu Beginn der *G1*-Phase in einem Komplex mit Faktoren der *E2F*-Familie vor und inhibiert deren Funktion als Transkriptionfaktoren (Weinberg, 1995); hyperphosphoryliertes *Rb* besitzt dagegen keine Affinität mehr zu *E2F* und als Folge kann die Expression von Genen, die wichtig für den *S*-Phasenübergang sind, durch das freigesetzte *E2F* aktiviert werden.

## Einleitung



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus von Säugerzellen unter besonderer Berücksichtigung der G1-Phase-Regulation.** Erklärungen zur Abbildung, siehe im Text. Die bekannten positiven oder negativen Wirkungen verschiedener Stimuli auf Zellzyklusfaktoren sind angegeben. cAMP: "cyclic Adenosin Monophosphate"; cyc D: "cyclin D"; cyc E: "cyclin E"; cdk2: "cyclin dependent kinase 2"; cdk4/6: "cyclin dependent kinase 4/6"; IL-2: Interleukin 2; Rb: Retinoblastom-Protein; UV: Ultraviolette Strahlung.

## **Glukokortikoide regulieren die Menge von Zellzyklusproteinen des G1/S-Phasenübergangs**

Glukokortikoidbehandlung verschiedener Zelllinien führt zu einem Block des Zellzyklus in der G1-Phase. Die G1-Phase ist die sensitivste Phase des Zellzyklus (zur Übersicht: Sherr, 1994). Positive und negative Regulation erfolgt nur innerhalb eines kurzen Zeitraums während der G1-Phase. Einige Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), PDGF (aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor), FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor) und Zytokine wie IL-2 (Interleukin 2) stimulieren in dieser Phase das Wachstum, während z.B. zyklisches Adenosyl-Mono-Phosphat (cAMP), TGF $\beta$  (transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ) und Serum-Hungern die Proliferation hemmen. Der negative Einfluß von Glukokortikoiden auf die Proliferation verschiedener Zelltypen konnte mit der negativen Regulation von Zellzyklusproteinen der G1-Phase in Zusammenhang gebracht werden. So führt die Hormonbehandlung einer lymphoiden Zelllinie zur Verminderung der Menge der zyklinabhängigen Kinasen cdk2 und cdk4 und von Zyklin D3 (Rhee et al., 1995; Reisman und Thompson, 1995). Zusätzlich zur negativen Regulation von Zyklinen und cdks ist die positive Regulation von cdk-Inhibitoren (cdkIs) durch Glukokortikoide bekannt. So führt die Hormonbehandlung einer Hepatom- und einer Fibroblastenzelllinie zur Induktion der Menge von p21 (Cha et al., 1998; Cram et al., 1998; Ramalingam et al., 1997).

Eine zusätzliche Wirkung von Glukokortikoiden auf das Wachstum von T-Zellen ist die Induktion von Apoptose.

## **Regulation der T-Zellapoptose durch Glukokortikoide**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein physiologischer Prozess, der unerwünschte Zellen beseitigt. Er kommt bei Gewebeumbildungen während der Embryogenese, der Reifung von Zellen des Immunsystems, der Regulation der Zellzahl und bei der Abwehr von in den Organismus eingedrungener Pathogene vor (zur Übersicht: White, 1996; Wertz, 1996; Jacobson, 1997). Eine Disregulation der Apoptose kann erhebliche pathologische Konsequenzen haben. So kann verminderte Apoptose, wie verstärkte Proliferation, neoplastische Veränderungen von Zellen begünstigen und ein Zuviel an Apoptose durch zu geringe Zellzahlen verschiedenste Krankheiten, wie z.B. Immundefizienzen zur Folge haben (Rinkenberger und Korsmeyer, 1997; Strasser et al., 1997). Die Induktion von Apoptose ist bei der Chemotherapie von Tumoren von erheblicher Relevanz, so z.B. als Bestandteil von Medikamenten bei der Behandlung von lymphoiden Tumoren (Coleman, 1992). Neben der lytischen Wirkung auf lymphoide Tumoren, wirken Glukokortikoide generell auf Immunzellen *In vitro* ist zumindest auch ein lytischer Effekt auf T-Zellen beschrieben worden (Boumpas et al., 1992), sodaß ein Teil der immunsupprimierenden Eigenschaften von Glukokortikoiden durch lytische Effekte auf Zellen des Immunsystem bedingt sein könnte.

## **Glukokortikoide induzieren Apoptose in Zellen des Immunsystems und lymphoiden Tumoren**

Die durch Glukokortikoide induzierte Lyse von lymphoiden Zellen, insbesondere Thymocyten und peripheren T-Zellen sowie lymphoiden Tumoren, erfolgt durch Apoptose (Wyllie, 1980). Der Apoptose unterliegt ein genetisches Programm, das durch endogene und exogene Faktoren reguliert wird (zur Übersicht: Schwartzman und Cidlowski, 1993). Bei der durch Glukokortikoide ausgelösten Lyse von lymphoiden Zellen treten charakteristische morphologische und biochemische Merkmale des programmierten Zelltodes auf, die sich eindeutig vom nekrotischen Zelltod unterscheiden.

Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Kondensation des Zytoplasmas und Chromatins der betroffenen Zelle, Fragmentierung des Zellkerns und schließlich der Zerfall der Zelle in viele membranumschlossene Körperchen ("apoptotic bodies"). Im Gegensatz dazu beginnen bei nekrotischen Zellen, nach einem entsprechenden Stimulus, Zytoplasma und Organellen anzuschwellen, ohne zunächst deutliche Veränderungen des Zellkerns erkennen zu lassen. Letztendlich wird die Plasmamembran durchlässig und zelluläre Bestandteile treten in den extrazellulären Raum aus, was innerhalb eines Gewebes Entzündungsreaktionen auslöst. Da im Gegensatz dazu bei der Apoptose die Plasmamembranen zunächst intakt bleiben, treten im allgemeinen keine Entzündungsreaktionen auf, jedoch machen Veränderungen an der Oberfläche der Zellmembran die apoptotischen Zellen für phagozytierende Zellen erkennbar (Martin et al., 1995).

Fast alle für die Apoptose typischen morphologischen und biochemischen Merkmale scheinen die Folge der Aktivität bestimmter Proteasen, sog. Caspasen (-> Cystein-Aspartasen), zu sein (zur Übersicht: White, 1996, Takahashi und Earnshaw, 1996; Nicholson und Thornberry, 1997). Diese Erkenntnis stammt aus Experimenten, bei denen spezifische Caspase-Inhibitoren alle für die Apoptose charakteristischen Merkmale hemmen konnten (Nicholson und Thornberry, 1997).

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihr Substrat innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz immer nach der Aminosäure Aspartat spalten. Sie liegen als Vorläuferproteine (Procaspasen) inaktiv im Zytoplasma vor und werden entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen zur aktiven Form gespalten. Nach neueren Erkenntnissen nimmt man an, daß ein apoptotischer Stimulus in einen Signalweg mündet, der die Aktivierung einer Caspase zur Folge hat. Von dieser Caspase aus setzt sich, wie in einer Kaskade, die Aktivierung weiterer Caspasen fort (Caspase-Kaskade-Modell, Nicholson und Thornberry, 1997). Am Ende dieser Kaskade steht die Spaltung einiger zellulärer Substrate wie z.B. Lamin, PARP-(Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase) und das Retinoblastom-Protein (Rb).

In Glukokortikoid-behandelten T-Zellen wurden typische Merkmale der Apoptose, wie die Aktivierung von Endonukleasen mit resultierender DNA-Fragmentierung (Wyllie, 1980; Cohen und Duke, 1984), Veränderungen in der Lipidzusammensetzung an der Außenseite der

Zellmembran (Martin et al., 1995) und Kalzium-Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma (McConkey et al., 1989) beschrieben.

Die Hemmung dieser apoptotischen Merkmale durch Caspaseinhibitoren spricht für die Aktivierung von Caspasen durch Glukokortikoide nach einem noch unbekanntem Mechanismus. Da die Glukokortikoid-induzierte Apoptose von Thymozyten in Abwesenheit von Proteinbiosynthese nicht erfolgt, ging man davon aus, daß ein hormoninduzierter Faktor die Apoptose einleitet (Wyllie, 1980).

### **Glukokortikoidinduzierte Apoptose: Induktion von Lysis- oder Repression von Überlebensgenen?**

Die durch Glukokortikoide induzierte Apoptose ist auf die Wirkung des hormonegebundenen, aktivierten Glukokortikoidrezeptors (GR) zurückzuführen. Dies bewiesen Experimente mit Thymozyten und lymphoiden Zelllinien, die keinen funktionellen GR exprimieren. In diesen Zellen kann durch Hormon keine Apoptose induziert werden (Sibley und Tomkins, 1974 I und II). Da der aktivierte GR Gene an- (transaktivieren) und abschalten (transreprimieren) kann, sind verschiedene Modelle zum Mechanismus der glukokortikoidinduzierten Apoptose denkbar. Der aktivierte GR könnte, nach dem sog. Lysisgen-Modell, die Expression eines Faktors induzieren, der für die Einleitung der Apoptose verantwortlich ist (proapoptotischer Faktor) oder, nach dem Überlebensgen-Modell, die Expression eines Faktors reprimieren, der für das Überleben einer Zelle notwendig ist (antiapoptotischer Faktor). Ferner sind äquivalente Modelle denkbar, bei denen intrazelluläre Signaltransduktionswege pro- oder antiapoptotische Funktionen haben könnten.

### **Regulation der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie**

Nicht alle Zellen, die den Glukokortikoidrezeptor (GR) exprimieren, gehen nach Behandlung mit Glukokortikoiden in die Apoptose, so zeigen Zellen des Immunsystems und verschiedene Lymphomlinien, die normalerweise empfindlich auf Glukokortikoide sind, eine große Bandbreite in ihrer Sensitivität nach einer Hormonbehandlung. Die Bandbreite reicht von sehr sensitiv bis vollständiger Resistenz gegenüber Glukokortikoiden (Smets et al., 1994). Die Ursachen solcher Resistenzphänomene korrelieren oft nicht mit der Expression eines mutierten oder fehlender Expression des GR, sondern lassen sich mit der Funktion von antiapoptotischen Faktoren oder mit Proteinen, die eine funktionelle Interaktion mit dem GR eingehen in Zusammenhang bringen (Jeon et al., 1997).

Eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Apoptose haben die Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie (zur Übersicht: Farrow und Brown, 1996; Strasser et al., 1997). Die Bcl-2-Genfamilie codiert für Proteine, die entweder vor Apoptose schützen oder Apoptose auslösen. So sind Bax und Bad Beispiele für Apoptose-fördernde Bcl-2-Proteine, während Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> eine antiapoptotische Funktion ausüben (Chao und Korsmeyer, 1998). Die relative

Menge von pro- zu antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen ist dabei ein wichtiger Parameter, der über die Einleitung von Apoptose entscheidet.

Für einige lymphoide Zelllinien wurde gezeigt, daß Überexpression von Bcl-2 einen partiellen Schutz vor Glukokortikoid-induzierter Apoptose gewährt (Miyashita und Reed, 1992; Caron-Leslie et al., 1994; Memon et al., 1995). Zusätzlich wurde beim Vergleich verschiedener lymphoider Zelllinien, die unterschiedlich sensitiv auf Glukokortikoide reagieren, eine inverse Korrelation der Expression des antiapoptotischen Bcl-2 zum proapoptotischen Bax gefunden (Salomons et al., 1997). Verschiedene Experimente deuten darauf hin, daß die antiapoptotischen Faktoren, z.B. Bcl-2 zu Anfang der Caspase-Kaskade regulierend eingreifen, doch der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt (Cryns und Yuan, 1998).

Die Funktion von Bcl-2 wird auch durch Interaktionen mit Faktoren unterstützt, die keine Homologie zu Mitgliedern der Bcl-2-Familie aufweisen. So interagiert z.B. BAG-1 der Maus mit Bcl-2 und schützt bei Überexpression zusammen mit Bcl-2 vollständig vor Fas- und Staurosporin-induzierter Apoptose (Takayama et al., 1995). Der Mechanismus, wie Bcl-2 und BAG-1 glukokortikoidinduzierte Apoptose verhindern ist noch nicht geklärt.

### **Das mit dem Glukokortikoidrezeptor interagierende Protein RAP46 ist ein Homolog zum antiapoptotischen Protein BAG-1**

In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, die die Identifikation von miteinander interagierenden Proteinen ermöglichen. Mit solchen Interaktionsklonierungen ist es u.a. möglich, Koaktivatoren bzw. Korepressoren von Transkriptionsfaktoren zu finden. Ferner können potentielle Interaktionspartner von Proteinen, bei denen eine Komplexbildung mit anderen Faktoren bereits bekannt oder zu erwarten ist, identifiziert werden.

Das menschliche Protein RAP46 ("receptor-associating protein", mit einem Molekulargewicht von etwa 46 kDa) ist ein mit dem aktivierten Glukokortikoidrezeptor interagierender Faktor (Zeiner und Gehring, 1995). Zusätzlich interagiert RAP46 noch mit anderen Steroid/Thyroid-Rezeptoren. Eine Koaktivatorfunktion von RAP46 konnte bisher weder zu einem der interagierenden Rezeptoren nachgewiesen werden, noch existieren experimentelle Hinweise auf eine Funktionalität der RAP46-GR-Interaktion.

Interessanterweise zeigt RAP46 eine starke Homologie zu BAG-1 der Maus. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen beider Proteine, so besteht mit Ausnahme des kürzeren aminoterminalen Bereichs von BAG-1, nahezu Identität.

BAG-1 wurde von verschiedenen Autoren als Protein beschrieben, das vor Apoptose schützen kann. So vermindert die Überexpression von BAG-1, zusammen mit Bcl-2, die Fas- und Staurosporin-induzierte Apoptose einer Thymomlinie (Takayama et al., 1995). BAG-1 bindet auch an bestimmte Wachstumsfaktor-Rezeptoren und unterstützt dabei deren antiapoptotische Wirkung (Bardelli et al., 1996). Die RAP46-GR-Interaktion könnte daher auch eine Schutzfunktion gegenüber Glukokortikoiden ausüben.

## **Zielsetzung der Arbeit**

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, welche die vorteilhaften Wirkungen von Glukokortikoiden vermitteln, könnte zur Entwicklung wirksamerer Medikamente für Glukokortikoid-Therapien führen. Es wird allgemein angenommen, daß die Repression von Genen allein für die nützlichen, immunsupprimierenden Eigenschaften von Glukokortikoiden verantwortlich ist.

Um dies zu bestätigen, sollte im Rahmen dieser Arbeit, der Beitrag von Aktivierung (Transaktivierung) und Repression (Transrepression) von Genen durch den Glukokortikoidrezeptor (GR), zur Wachstumshemmung von T-Zellen bestimmt werden.

Die Wachstumshemmung von T-Zellen durch Glukokortikoide erfolgt durch Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose. Alle Experimente wurden daher in einer Maus-Thymomlinie durchgeführt, in der diese beiden Prozesse durch Glukokortikoide ausgelöst werden. Dabei sollte zunächst der Glukokortikoid-induzierte Zellzyklusblock genauer charakterisiert werden, wobei der Einfluß von Glukokortikoiden auf die Expression von Zellzyklusfaktoren von besonderem Interesse war.

Zusätzlich sollte der Beitrag von Transaktivierung und Transrepression des GR zum Zellzyklusblock und zur Apoptose bestimmt werden. Dies sollte durch stabile Expression einer "dissoziierenden" GR-Mutante in Rezeptor-negativen Thymomzellen versucht werden. Da diese GR-Mutante nicht mehr transaktiviert, aber immer noch transreprimiert, kann mit diesem experimentellen Ansatz bestimmt werden, ob die negative Regulation von Genen für die Wachstumshemmung durch Glukokortikoide ausreicht.

Im letzten Teil der Arbeit sollte das mit dem Glukokortikoidrezeptor assoziierende Protein RAP46 funktionell charakterisiert werden. Dabei wurde die Frage gestellt, ob die Interaktion eine Auswirkung auf die Funktionen des Rezeptors hat. Dazu sollte RAP46 in Zellen exprimiert werden, die durch Glukokortikoide im Wachstum gehemmt werden und der Einfluß von RAP46-Expression auf die transkriptionellen Eigenschaften des GR und die möglichen Auswirkungen auf die Wachstumshemmung bestimmt werden.

## **Ergebnisse**

### **Teil 1: Regulation des Zellzyklus und der Apoptose von T-Zellen durch Glukokortikoide**

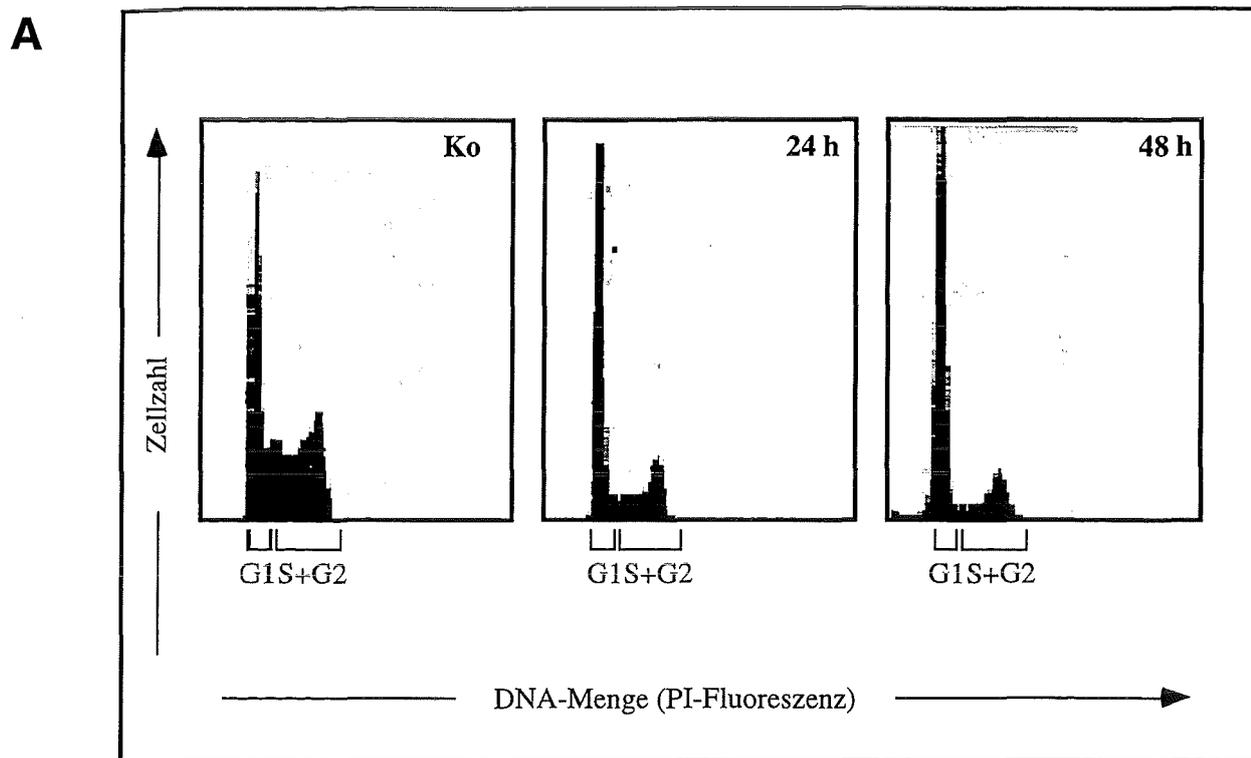
Der negative Einfluß auf das Wachstum von T-Zellen ist einer der Mechanismen, wie Glukokortikoide die Immunantwort eines Organismus hemmen. Dies geschieht durch Proliferationshemmung und Induktion von Apoptose durch molekulare Mechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind. Neben indirekten Effekten von Glukokortikoiden durch negative Regulation von T-Zell-Wachstumsfaktoren wie IL-2 (Interleukin 2), ist auch eine direkte Einflußnahme auf die Komponenten der Zellzyklusregulation, den Zyklinen und zyklinabhängigen Kinasen bekannt. Im folgenden wurde untersucht, welche Effekte das synthetische Glukokortikoid Dexamethason auf das Wachstum der Thymom-Zelllinie S49.1 (van Daalen Wetters & Coffino, 1987) hat und welche Zellzyklusfaktoren dabei betroffen sind. S49.1-Zellen sind ein geeignetes System für Zellzyklusuntersuchungen, da in diesen Zellen der Zellzyklusblock durch Dexamethason zeitlich der Apoptose vorausgeht, das heißt alle Untersuchungen können innerhalb eines Zeitintervalls durchgeführt werden, in dem keine signifikante Apoptose stattfindet (van Daalen Wetters & Coffino, 1987).

#### **Dexamethasonbehandlung von S49.1-Zellen führt zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus ("G1-Block")**

Während des Zellzyklus durchläuft die Zelle verschiedene Phasen, die durch ihre charakteristischen DNA-Mengen gekennzeichnet sind. Während der S-Phase wird die einfache DNA-Menge des doppelten Chromosomensatzes (2N) der G1-Phase durch Replikation auf die zweifache Menge der G2-Phase vermehrt (4N) und dann während der Mitose durch Trennung in zwei Schwesterchromosome und anschließender Zellteilung wieder auf die einfache DNA-Menge reduziert. Durch DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe kann die DNA-Menge und somit die Position einer Zelle im Zellzyklus durchflußzytometrisch bestimmt werden.

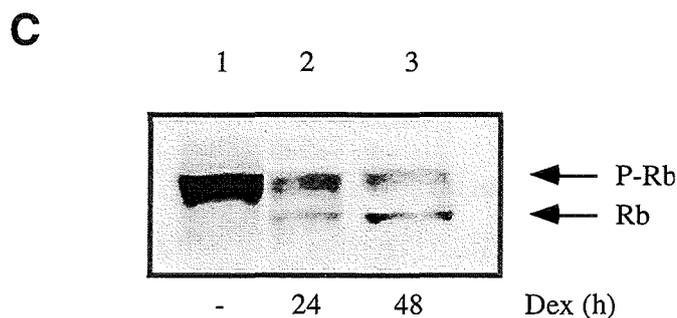
Um den Einfluß von Glukokortikoiden auf den Zellzyklus von S49.1-Zellen zu untersuchen, wurden diese 24 und 48 Stunden mit Dexamethason (Dex) oder nicht behandelt, Kerne isoliert und die DNA mit Propidiumjodid gefärbt und anschließend die DNA-Menge pro Zellkern mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

Die Behandlung von logarithmisch wachsenden Kulturen mit Dex führte bereits nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der G1-Population mit einfacher DNA-Menge (Abb. 4A).



**B**

	G1	S+G2
Ko	46 ± 7	54 ± 7
24 h	60 ± 5	40 ± 5
48 h	72 ± 6	28 ± 6



**Abb. 4: Zellzyklus-Block und Aktivierung von Rb in S49.1-Zellen durch Dexamethason.** Exponentiell wachsende S49.1-Zellen wurden 24 oder 48 Stunden mit 0,1  $\mu$ M Dexamethason oder nicht behandelt (Ko). **A.** Von einem kleinen Teil wurde die DNA-Menge mittels Propidiumjodid-Färbung von Zellkernen durchflußzytometrisch bestimmt. **B.** Tabellarische Zusammenfassung mehrerer (mind. 3 pro Punkt) Experimente mit Angabe der Zellzyklusverteilung und der Standardabweichungen in Prozent. **C.** Immunoblot-Analyse von 100  $\mu$ g Proteinextrakt mit einem Antikörper gegen Rb, hyperphosphoryliertes (P-Rb) und hypophosphoryliertes (Rb) Rb sind mit Pfeilen markiert.

Im Vergleich zu unbehandelten Kulturen steigt sie von 46 % auf 60 % an, bei gleichzeitiger Abnahme der S- und G2-Phasen-Population (Abb. 4B). Die Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus setzte sich bis zu 48 Stunden fort; je nach Experiment setzen zu diesem Zeitpunkt schon apoptotische Prozesse ein. Besonders deutlich ist die Abnahme der Anzahl an Zellen, die sich in der DNA-Synthesephase (S-Phase) befinden (Abb. 4A), was deutlich auf einen Block des G1/S-Phasenübergangs durch Dex im Zellzyklus der S49.1-Zellen hinweist.

Die Experimente bestätigen somit, daß T-Zellen nach Glukokortikoid-Behandlung in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren.

Um die molekularen Ursachen des Zellzyklusblocks durch Dex besser zu verstehen, wurde der Einfluß von Hormon auf die regulatorischen Proteine der G1-Phase untersucht.

### **Dexamethason aktiviert das Retinoblastom-Protein (Rb)**

Das Retinoblastomprotein (Rb) ist ein Phosphoprotein und übt in seiner aktiven, unterphosphorylierten Form einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von Zellen aus (Weinberg, 1995).

Im folgenden wurde untersucht, ob die Wachstumshemmung von S49.1-Zellen auf der Aktivierung von Rb beruht. Dazu wurden Immunoblotanalysen mit Proteinextrakten aus unbehandelten und Dexamethason-(Dex)-behandelten S49.1-Kulturen durchgeführt. Die inaktive, überphosphorylierte Form von Rb ist durch ihr unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von der aktiven, unterphosphorylierten Form unterscheidbar. In unbehandelten, exponentiell wachsenden Kulturen ist nur inaktives, phosphoryliertes Rb (P-Rb) detektierbar (Abb. 4C, Spur 1), was auf der recht kurzen Zellzyklusdauer von S49.1-Zellen (~14-18 Stunden) beruht. Durch Dex-Behandlung wird bereits nach 24 Stunden aktives, unterphosphoryliertes Rb (Rb) sichtbar (Abb. 4C, Spur 2), dessen relative Menge im Vergleich zum inaktiven Rb bis mindestens 48 Stunden weiter zunimmt (Abb. 4C, Spur 3). Die Induktion der aktiven, unterphosphorylierten Form von Rb könnte demnach die Ursache für die Wachstumshemmung von S49.1-Zellen nach Dex-Behandlung sein.

Die Phosphorylierung von Rb erfolgt durch katalytisch aktive Komplexe, die aus Zyklinen (cycs) und zyklinabhängigen Kinasen (cdks) zusammengesetzt sind (Abb. 4). Die Voraussetzung für die Bildung von cyc/cdk-Komplexen und die Phosphorylierung und Inaktivierung von Rb ist die Expression von cycs und cdks. Es wurde daher als nächstes der Einfluß von Glukokortikoiden auf die Expression von cycs und cdks untersucht.

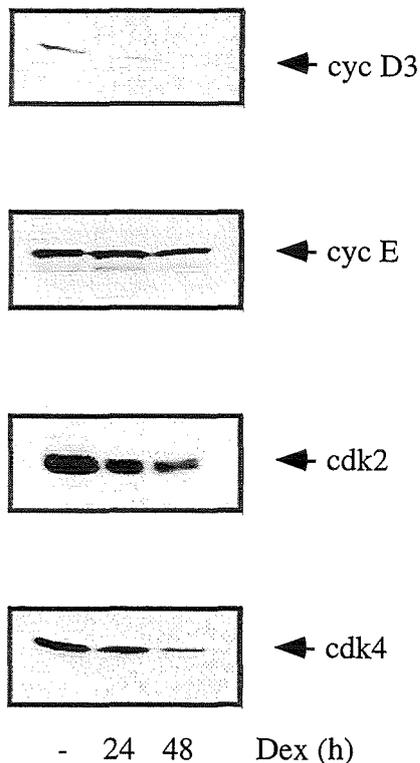
### **Die Menge der G1-Zellzyklusproteine Zyklin D3, cdk2 und cdk4 wird durch Dexamethason erniedrigt; die Menge an cyclin E bleibt konstant**

Die bis heute in höheren Organismen identifizierten Zykline (cycs) und zyklinabhängigen Kinasen (cdks), die das Retinoblastom-Protein (Rb) phosphorylieren und den G1/S-Phasenübergang ermöglichen, sind die D-Typ-Zykline cyc D1, D2 und D3, die mit den Kinasen cdk4 und cdk6 aktive Kinasekomplexe bilden und cyc E, das mit cdk2 einen Komplex bildet. Da in anderen Zellsystemen von cyc D3, cdk2 und cdk4 eine negative Regulation durch Glukokortikoide bekannt ist (Reisman und Thompson, 1995; Rhee et al., 1995) und cyc D3, das in lymphoiden Zellen hauptsächlich vorkommende D-Typ-Zykin ist, wurde in den

## Ergebnisse

folgenden Experimenten der Einfluß von Hormonbehandlung auf die Expression von diesen Komponenten durch Immunoblotanalysen untersucht. Zusätzlich wurde cyc E, auf das ein Einfluß von Dexamethason (Dex) nicht bekannt ist, in die Untersuchungen einbezogen.

Die Behandlung von S49.1-Zellen mit Dex führt zu einer drei- bis vierfachen Erniedrigung der cyc D3-Proteinmenge nach bereits 24 Stunden (Abb. 5, oberste Teilabbildung), während die Menge von cyc E sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Hormonbehandlung unverändert blieb (Abb. 5, zweite Teilabbildung von oben). Die Proteinmenge der beiden Kinasen cdk2 und cdk4 waren ebenfalls 1,5- bzw. 3-fach erniedrigt (Abb. 5, dritte und vierte Teilabbildung von oben).



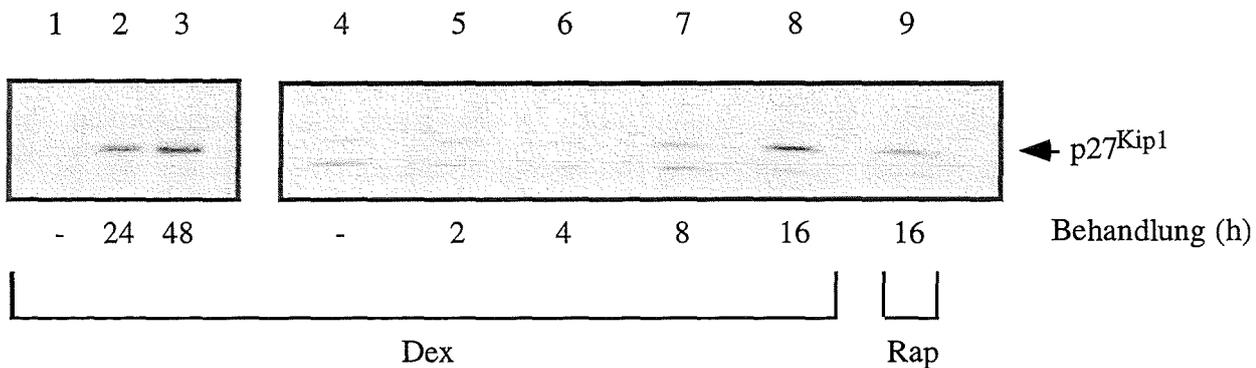
**Abb. 5: Negative Regulation von cyc D3, cdk2 und cdk4 durch Glukokortikoide.** 100 µg Proteinextrakt von nicht oder 24 bzw. 48 Stunden mit Dex behandelten S49.1-Zellen wurden durch eine 10 %ige SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die angezeigten Proteine durch Immunoblot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert. Die von den entsprechenden Antikörpern erkannten Proteine sind durch Pfeile markiert.

Der negative Effekt von Dex auf die Expression von Faktoren, die eine Phosphorylierung und Inaktivierung von Rb katalysieren und damit den G1/S-Phasenübergang begünstigen, wurde auch in anderen lymphoiden Zellen beobachtet und als mögliche Ursache für die Proliferationshemmung durch Glukokortikoide vorgeschlagen (Reisman und Thompson, 1995; Rhee et al., 1995). Zusätzlich zur negativen Regulation von cycs und cdks, kann auch eine positive Regulation von Proteinen, die cdk-Aktivität hemmen, zu einem G1-Block im Zellzyklus führen. Da solche, erst seit kürzerer Zeit bekannte cdk-Inhibitoren (cdkIs), durch proliferationshemmende (antimitogene) Substanzen, wie z.B. cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), induzierbar sind, stellte sich die Frage, ob auch Glukokortikoide die Menge von cdkIs regulieren können.

## Glukokortikoide induzieren die Menge des Inhibitors von Zyklin-abhängigen Kinasen p27<sup>Kip1</sup>

Die Inhibitoren von zyklinabhängigen Kinasen (cdk-Inhibitoren, cdkIs) verhindern die Bildung von cyc/cdk-Komplexen oder hemmen, als Teil dieses Komplexes, die cdk-Aktivität (Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). Die Regulation der Menge von cdkIs ist ein erst seit kurzem bekannter Mechanismus, die G1/S-Phase-Progression von Zellen zu kontrollieren.

Da in T-Zelllinien wachstumshemmende Substanzen wie TGF $\beta$  (Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ), cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) oder das Immunsuppressiva Rapamycin zu einer Erhöhung der Menge des cdk-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> führen (Polyak et al., 1994; Kato et al., 1994; Nourse et al., 1994), wurde im folgenden durch Immunoblot-Analysen der Einfluß von Dexamethason (Dex) auf die p27<sup>Kip1</sup>-Expression in S49.1-Zellen untersucht. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Rapamycin behandelt.



**Abb. 6: Kinetik der p27<sup>Kip1</sup>-Proteininduktion durch Dexamethason.** Je 100  $\mu$ g Proteinextrakt von nicht oder unterschiedlich lange mit Dexamethason behandelten S49.1-Zellen wurden durch 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und p27<sup>Kip1</sup> durch Immunoblot-Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern detektiert. Die für p27<sup>Kip1</sup> spezifische Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Ergebnisse beider Teilabbildungen stammen aus unabhängigen Experimenten unter Verwendung verschiedener Antikörper; in der rechten Teilabbildung wurden mit 1  $\mu$ M Rapamycin behandelte Zellen als positive Kontrolle verwendet.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Menge an p27<sup>Kip1</sup>-Protein in hormonbehandelten Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden um das 5- bis 10-fache erhöht ist (Abb. 6, Spuren 2 und 3 im Vergleich zu Spur 1). Die Menge an p27<sup>Kip1</sup> nimmt dabei nach einer anfänglichen Lag Periode von 6 Stunden deutlich zu und ist bereits nach 8 Stunden signifikant erhöht. (Abb. 6, rechte Teilabbildung, Spur 7 im Vergleich zu Spur 4). Interessanterweise ist dieser Effekt 16 Stunden nach Dex-Behandlung stärker, als 16 Stunden nach Rapamycin, einem bekannten Induktor von p27<sup>Kip1</sup>-Protein (Abb. 6, rechts Spur 8 im Vergleich zu 9). Bei der Zeitkinetik bis 48 Stunden (Spuren 1 bis 3) wurde bei der Immunoblotanalyse ein anderer Antikörper gegen p27<sup>Kip1</sup> verwendet; dabei wird kein zweites Signal, wie bei der kurzen Kinetik (Spuren 4 bis 9) detektiert. Eine mögliche Erklärung dafür wird später gegeben.

Die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> durch Glukokortikoide ist somit ein weiterer Mechanismus der negativen Regulation des G1/S-Phasenübergangs von T-Zellen.

Für Induktoren der p27<sup>Kip1</sup>-Menge wurde neben einem G1- Zellzyklus-Block auch die Hemmung der G1-spezifischen zyklinabhängigen Kinasen (cdks) gezeigt. So sind Rapamycin und cAMP wirksame Inhibitoren der cdk2. Wenn die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> für den Mechanismus des Zellzyklusblocks durch Glukokortikoide relevant ist, dann sollte Glukokortikoidbehandlung von S49.1-Zellen zu einer Hemmung der Aktivität von cdks führen. Es wurde daher im folgenden der Einfluß von Dex auf die cyc E-assoziierte cdk2-Aktivität untersucht.

### **Die zyklinabhängige Kinase cdk2 wird durch Dexamethason gehemmt**

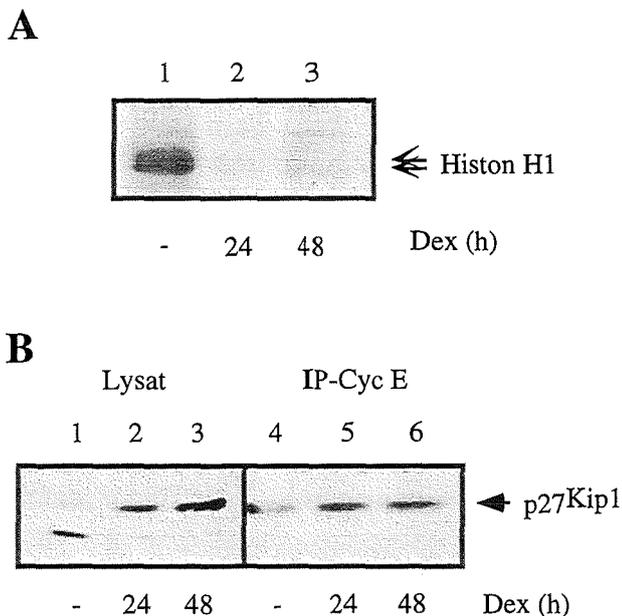
Es ist bekannt, daß p27<sup>Kip1</sup> Zyklin E-(cyc E)-assoziierte cdk2-Aktivität durch Bindung an den cyc E/cdk2-Komplex inhibiert und daß die Phosphorylierung bestimmter Substrate wie Rb und Histon durch die cdk2 Voraussetzung für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus ist. Ist die in den Immunoblotanalysen gefundene Akkumulation des p27<sup>Kip1</sup>-Protein für den Zellzyklus-Block in S49.1-Zellen durch Dexamethason (Dex) verantwortlich, dann sollte die Aktivität von cdks gehemmt sein. Um zu zeigen, daß die erhöhte Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Protein in Dex-behandelten S49.1-Zellen die cdk2-Aktivität hemmt, wurden unter Verwendung von cyc E-spezifischen Antikörpern aus Proteinextrakten von nicht oder Dex-behandelten S49.1-Zellen cyc E und die daran assoziierte Kinase koimmunopräzipitiert. In einem *in vitro*-Kinaseassay wurde anschließend die Aktivität der isolierten cdk2 unter Verwendung des Histons H1 als Substrat bestimmt.

Das Experiment zeigte, daß Dex-Behandlung bereits nach 24 Stunden zu einer vollständigen Hemmung der cdk2-Aktivität führt (Abb. 7A, vergleiche Spur 1 mit 2). Im Vergleich zur Kontrollbehandlung erfolgte parallel zum Verlust der Kinase-Aktivität ein etwa dreifacher Anstieg der Menge an p27<sup>Kip1</sup>-Protein im cyc E/cdk2-Komplex (Abb. 7B, vergleiche Spur 5 mit 4). Das bereits in unbehandelten S49.1-Zellen mit cyc E/cdk2 assoziierte p27<sup>Kip1</sup> kommt entweder von Zellen der exponentiell wachsenden Kultur, die sich in der G1-Zellzyklus-Phase befinden, in der p27<sup>Kip1</sup>-Protein erhöht ist und/oder bestätigt eine neuere Erkenntnis, die besagt, daß p27<sup>Kip1</sup>, neben seiner Funktion als cdk-Inhibitor, zusätzlich die eines Adaptormoleküls beim Aufbau eines aktiven cyc/cdk-Komplexes hat (LaBaer et al., 1997). Die Hormonbehandlung bis 48 Stunden ergibt keine weiteren Veränderungen, die cdk2 bleibt vollständig gehemmt und die Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Protein im Komplex mit cyc E und cdk2 bleibt konstant (Abb. 7A, Spur 3 und Abb. 7B, Spur 6), obwohl die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge im Zellysat 48 Stunden nach Dex-Behandlung weiter steigt (Abb. 7B, Spur 3). Dies läßt sich auf eine Sättigung der p27<sup>Kip1</sup>-Bindestellen im cyc E/cdk2-Komplex zurückführen, die sich bereits 24 Stunden nach Dex durch eine vollständige Hemmung der cdk2-Aktivität zeigt. Auffällig ist, daß nach der IP mit cyc E-Antikörpern nur ein Signal mit dem p27<sup>Kip1</sup>-Antikörper detektiert wird und nicht wie vor

## Ergebnisse

der IP im Lysat zwei (Abb. 7B). Das im Lysat detektierte Protein mit einer molekularen Größe von etwa 20 kDa könnte unspezifischer Natur sein, oder einer kleineren Form von p27<sup>Kip1</sup> entsprechen. Denkbar ist, daß der gegen das carboxyterminale Ende von p27<sup>Kip1</sup> gerichtete Antikörper (Abb. 6, Spur 1 bis 3) eine im Carboxyterminus verkürzte Form von p27<sup>Kip1</sup> nicht mehr binden kann, demnach nur ein spezifisches Signal in der Immunoblot-Analyse erkennen lassen sollte. Im Gegensatz dazu würde der gegen das aminoternale Ende von p27<sup>Kip1</sup> gerichtete Antikörper (Abb. 6 Spur 4 bis 9; Abb. 7B), der auch an die verkürzte Form binden kann, zwei Signale detektieren.

Daß die Menge des durch den carboxyterminalen Antikörper erkannten Proteins durch Dex und Rapamycin invers zur p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge abnimmt (Abb. 6, Spuren 4 bis 9 und Abb. 7B, Spuren 1 bis 3) ist ein interessantes Ergebnis. Da dieses Protein aber nicht mit dem cyc E/cdk2-Komplex assoziiert und damit nicht für die die Hemmung der cdk2-Aktivität relevant ist, wurde dieser Befund im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.



**Abb. 7: Dex hemmt cdk2-Aktivität durch Induktion von p27<sup>Kip1</sup>.** A. Mit Proteinextrakten von je 10<sup>7</sup> S49.1-Zellen, die unterschiedlich lange mit 0,1 µM Dex- oder dem Lösungsmittel Ethanol behandelt waren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit cyc E-spezifischen Antikörpern durchgeführt, die Immunkomplexe durch Bindung an Protein-A-Sepharose gewonnen und ein Immunkomplex-Kinase-Assay in Anwesenheit von Histon H1 und <sup>32</sup>P-αdCTP durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Die Reaktionen wurden durch 10 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Pfeile weisen auf die für <sup>32</sup>P-kinasierten spezifischen Banden von Histon H1 hin. B. Proteinextrakte vor der Immunpräzipitation (Lysat) und durch cyc E-Antikörper präzipitierte cyc E-assozierte Proteine (IP-cycE) wurden durch 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Immunoblotanalyse mit einem spezifischen Antikörper die Menge von p27<sup>Kip1</sup> bestimmt.

Die Experimente belegen, daß die induzierte Zunahme der Menge an p27<sup>Kip1</sup> durch Dex zur Hemmung der entsprechenden Zyklin-abhängigen Kinase cdk2 führt. Diese Hemmung erfolgt offensichtlich durch verstärkte Bindung von p27<sup>Kip1</sup> an den cyclin E/cdk2-Komplex. Glukokortikoide könnten daher, zusätzlich zur Verringerung der Menge an cyc D3 und durch Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge, verbunden mit der cdk2-Hemmung, das Retinoblastom-Protein aktivieren und damit den G1/S-Phasenübergang und das Wachstum von T-Zellen hemmen. Die induzierten Mengen von p27<sup>Kip1</sup>-Protein scheinen daher eine entscheidende Rolle beim Zellzyklusblock durch Glukokortikoide zu spielen.

Die Erhöhung der Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Protein kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen.

Im folgenden wurde untersucht, durch welchen Mechanismus Glukokortikoide die Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Protein erhöhen.

## **Die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup>-Protein wird durch Dexamethason verlängert**

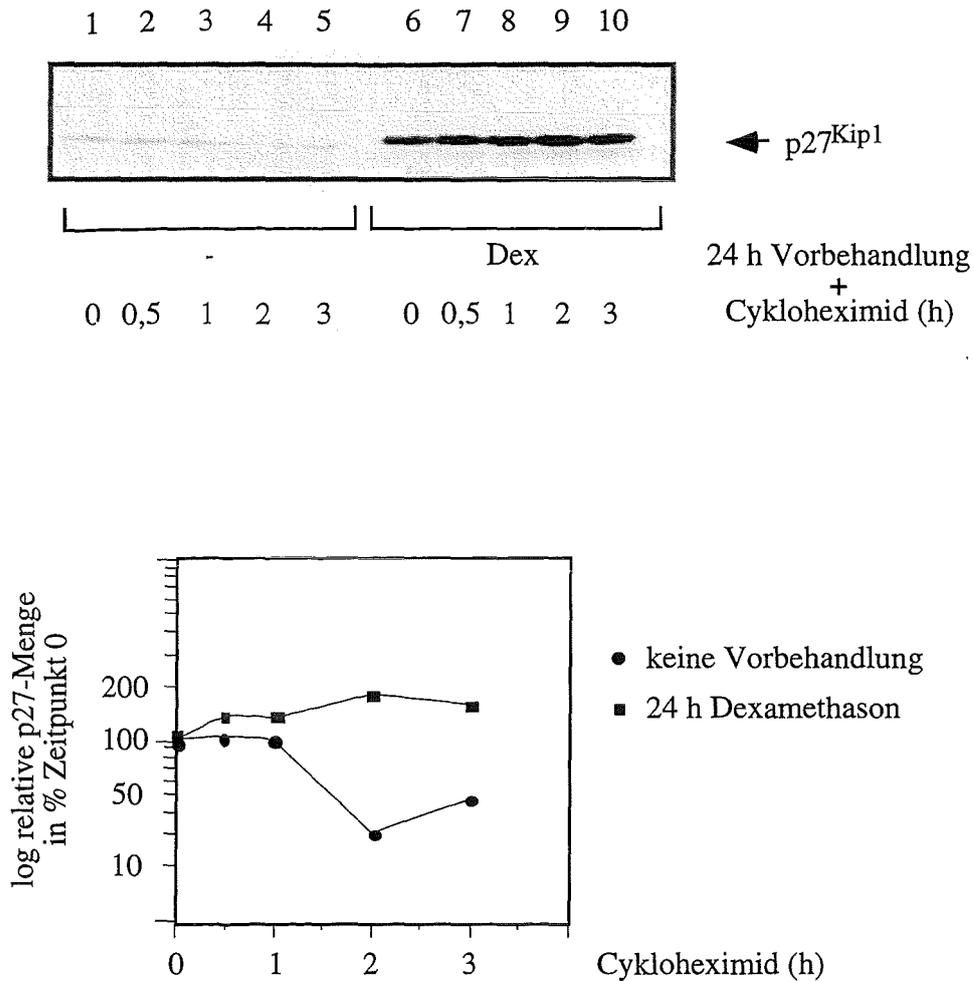
Für die positive Regulation von p27<sup>Kip1</sup> auf Proteinebene wurden bisher zwei Mechanismen beschrieben: Bei Kontaktinhibition von Zellen erfolgt eine Steigerung der Translationsrate beim G0/G1-Arrest (Hengst und Reed, 1996) und beim Wachstumsstopp durch Entfernen essentieller Wachstumsfaktoren, eine Inaktivierung des proteolytischen Ubiquitin-Systems (Pagano et al., 1995).

Um die Möglichkeit einer Proteinstabilisierung durch Dex zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup> in An- und Abwesenheit von Hormon bestimmt. Dazu wurden S49.1-Zellen 24 Stunden mit oder ohne Dex kultiviert, anschließend die Translation durch Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid gestoppt und der Abbau von p27<sup>Kip1</sup>-Protein über einen Zeitraum von drei Stunden durch Immunoblotanalyse verfolgt.

Die basale p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge von nicht vorbehandelten S49.1-Zellen ist etwa ein bis zwei Stunden nach Cycloheximidgabe zur Hälfte abgebaut (Abb. 8, obere Teilabbildung, vergleiche Spur 3 und 4 und untere Teilabbildung). Im Gegensatz dazu verringert sich die Menge von p27<sup>Kip1</sup> in Dex-behandelten Zellen über den Zeitraum des Experiments nicht (Abb. 8, obere Teilabbildung Spuren 6 bis 10 und untere Teilabbildung). Die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup> liegt daher in hormonbehandelten Zellen bei mehr als drei Stunden. Die durch Laserdensitometrie quantifizierten p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmengen ergaben eine Halbwertszeit für p27<sup>Kip1</sup>-Protein von etwa 1,5 Stunden; berücksichtigt man eine lag-Phase von 15 bis 30 Minuten für die Zeit, die Cycloheximid für einen vollständigen Translationsstopp benötigt, so liegt die Halbwertszeit eher bei einer Stunde. Dies entspricht exakt der Halbwertszeit, die in einer Ratten-Hepatom-Zelllinie gemessen wurde (Kumar Kolluri, IGEN, persönliche Mitteilung) und etwa der in Fibroblasten durch "Pulse-Chase-Analyse" (keine lag-Phase durch Translationshemmer) bestimmten Halbwertszeiten des p27<sup>Kip1</sup>-Protein von etwa 50 Minuten (Pagano et al., 1995). Die Resistenz der induzierten p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge gegen Cycloheximidbehandlung ist ein guter Hinweis auf einen posttranslatorischen Mechanismus für die Induktion von p27<sup>Kip1</sup>-Protein durch Dex in S49.1-Zellen.

Posttranslationale Mechanismen, insbesondere die Regulation der Proteinstabilität, wird von einigen Autoren für die Mengenregulation von Zellzyklusproteinen im Zellzyklus vorgeschlagen. Eine wichtige Rolle für die Stabilität von G1-spezifischen Proteinen scheint der PI3-Kinase zuzukommen. Es wurde postuliert, daß PI3-Kinase-Aktivität die Destabilisierung von p27<sup>Kip1</sup> und Stabilisierung von Zyklin D3 (cycD3) vermittelt (Brennan et al., 1997). Ob der PI3-Kinase-Signalweg bei der Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup> durch Dex beteiligt ist, wurde in den nächsten Experimenten untersucht.

## Ergebnisse



**Abb. 8: Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup> in S49.1-Zellen durch Dexamethason.** S49.1-Zellen wurden 24 h mit 0,1  $\mu$ M Dex oder dem Lösungsmittel Ethanol vorbehandelt. Nach Zugabe von 40  $\mu$ g/ml Cycloheximid wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proteinextrakte von gleichvielen Zellen hergestellt. Nach Auftrennung der Proteine durch 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Der Pfeil der oberen Teilabbildung deutet auf die durch den Antikörper erkannte spezifische Bande. Die untere Teilabbildung ist die Quantifizierung des obigen Experiments; in der Graphik ist der Zeitpunkt der Ernte nach dem Cycloheximid-Stimulus gegen den Logarithmus der durch Laserdensitometrie errechneten Signalstärken aufgetragen. Signalstärken zum Zeitpunkt Null wurden 100 % gesetzt.

## **Dexamethason hemmt die p70/p80 S6-Kinase, eine Komponente des PI3-Kinase-Signalwegs**

Der Einfluß von Dexamethason (Dex) auf den PI3-Kinase-Signalweg in S49.1-Zellen wurde im folgenden durch Messung des Phosphorylierungsgrades der p70/p80 S6-Kinase (p70/85 S6k) bestimmt. Die p70/85 S6k reguliert die Translationseffizienz bestimmter mRNA-Spezies, die wichtig für die G1/S-Phase-Progression sind (Thomas und Hall, 1997). Die p70/85 S6K ist eine Komponente des PI3-Kinase-Signalwegs unterhalb der PI3-Kinase und daher ein guter Indikator für die Aktivität des PI3-Kinase-Signalwegs. Alternatives Spleißen des ersten Exons führt zur Expression zweier Isoformen, einer schwächer exprimierten 85 kDa- und einer 70 kDa-Isoform, die den Hauptanteil an der p70/85 S6k -Expression ausmacht.

Die p70 S6k wird durch sukzessive Phosphorylierung aktiviert, wobei nur die am stärksten phosphorylierte Form aktiv ist (Monfar und Blenis, 1996). In der SDS-Gelelektrophorese sind die unterschiedlich phosphorylierten Proteine aufgrund ihres Laufverhaltens gut zu unterscheiden. Je stärker phosphoryliert das Protein ist, desto langsamer wandert das Protein im Gel, wobei nur die langsamste Bande der aktiven Kinase entspricht. Im folgenden sollte untersucht werden, ob der Phosphorylierungsgrad der Kinase in Zellen verändert ist, die mit Dex behandelt wurden.

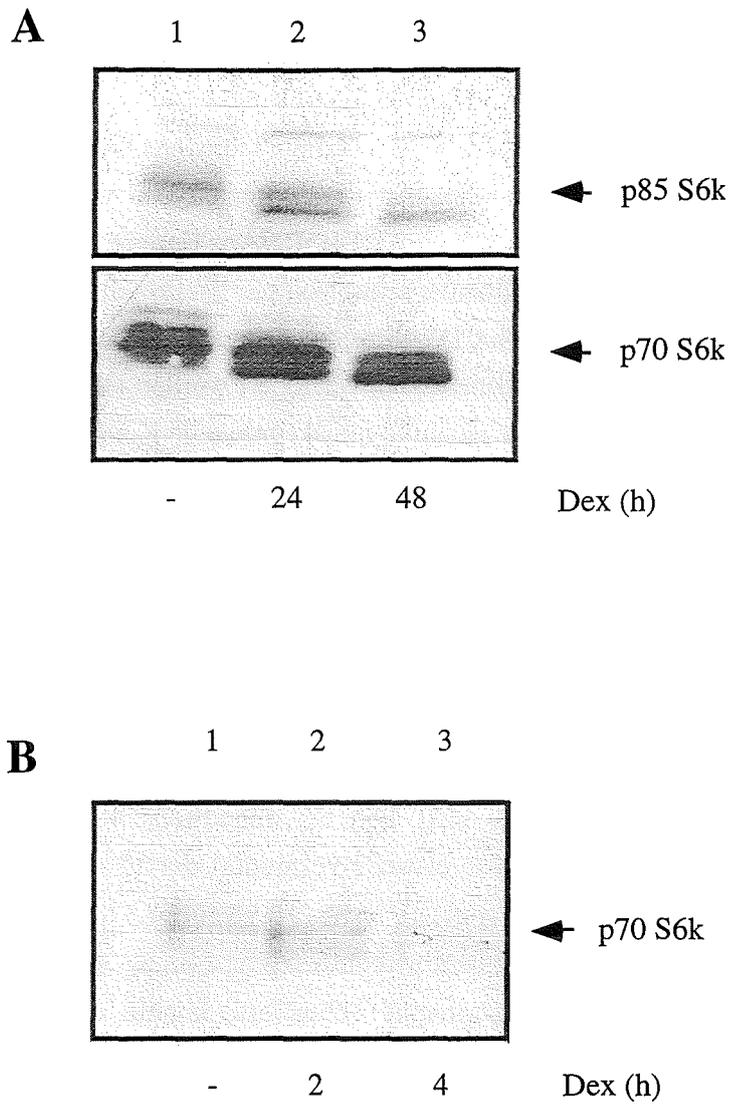
Die Aktivität der p70/85 S6k wurde durch Immunoblot-Analysen mit Extrakten von hormonbehandelten und unbehandelten S49.1-Zellen analysiert.

Die Dex-Behandlung von S49.1-Zellen hatte die Akkumulation von weniger phosphorylierten Formen der p70/85 S6k zur Folge, bei gleichzeitigem Verschwinden der hyperphosphorylierten Formen nach 24 und 48 Stunden (Abb. 9A, Spur 2 und 3). Eine kürzere Kinetik zeigte, daß Dex nach bereits zwei Stunden zu einer Veränderung der Phosphorylierung von p70/85 S6k führt (Abb. 9B, vergleiche Spur 2 mit Spur 1). Die Experimente implizieren eine Interferenz mit der Signalübertragung zwischen der PI3-Kinase und p70/85 S6k. Dies wird durch kürzlich veröffentlichte Daten, die in einer anderen T-Zelllinie gefunden wurden bestätigt (Monfar und Blenis, 1996).

Die negative Regulation der p70/85 S6k durch Dex bzw. Komponenten des PI3-Kinase-Signalwegs könnte demnach zur Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup> durch Glukokortikoide und damit zur Proliferationshemmung von T-Zellen beitragen.

Jedoch sind andere Mechanismen, die zur Akkumulation des p27<sup>Kip1</sup>-Proteins durch Glukokortikoide führen, nicht auszuschließen. Es wurde deshalb untersucht, ob Hormonbehandlung von S49.1-Zellen einen Einfluß auf p27<sup>Kip1</sup>-mRNA hat.

Ergebnisse



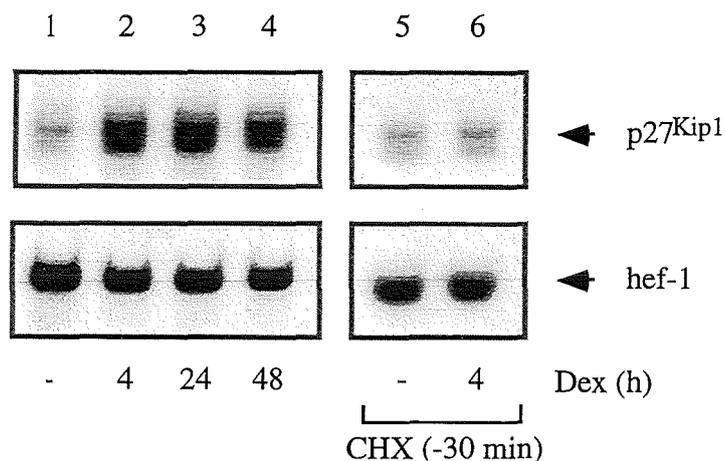
**Abb. 9: Hemmung der p70/85 S6-Kinase durch Dexamethason:** Je 100 µg Proteinextrakt von Dex-behandelten und unbehandelten S49.1-Zellen wurden durch 10 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und p70/85 S6k durch Immunoblotanalyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern detektiert. **A.** Kinetik bis 48 Stunden Dex unter zusätzlicher Berücksichtigung der p80 S6k. **B.** Kinetik bis 4 Stunden Dex. Die Pfeile deuten auf die für p70 S6k und p80 S6k spezifischen Banden.

## Dexamethason induziert p27<sup>Kip1</sup>-mRNA

Die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge kann sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene reguliert sein. Die bisher untersuchten Induktoren von p27<sup>Kip1</sup>, TGFβ (Transformierender Wachstumsfaktor β), cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat) und Rapamycin wirken über translatorische (Erhöhung der Translationsrate von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA; Hengst und Reed, 1996) bzw. posttranslatorische Mechanismen (Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein; Pagano et al., 1995). Nur in G0-T-Lymphozyten konnte durch CD3-Rezeptor-Stimulation die p27<sup>Kip1</sup>-mRNA-Menge und die Aktivität von p27<sup>Kip1</sup>-Promotorkonstrukten verringert werden (Kwon et al., 1996; Kwon et al., 1997), sodaß in diesem Fall eine negative transkriptionelle Kontrolle wahrscheinlich ist.

Um einen transkriptionellen Mechanismus bei der Hormoninduktion von p27<sup>Kip1</sup> nachzuweisen, wurde zunächst in Northern-Blot-Analysen die Menge von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA von nicht bzw. unterschiedlich lange mit Dexamethason (Dex) behandelten S49.1-Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden S49.1-Zellen, um Proteinneusynthese zu verhindern, 30 min mit Cykloheximid (CHX) vorbehandelt und für weitere vier Stunden nicht oder mit Dex behandelt.

Es zeigte sich, daß Dex-Behandlung nach spätestens vier Stunden zu einer etwa dreifach gesteigerten Menge des p27<sup>Kip1</sup>-Transkripts führt (Abb. 10, vergleiche Spur 2 mit 1). Dieses erhöhte Niveau von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA setzt sich bis mindestens 48 Stunden Behandlung fort (Abb. 10, Spuren 3 und 4). Interessanterweise verhindert die 30 minütige Vorbehandlung mit CHX die Dex-Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA (Abb. 10, Spuren 5 und 6). Obwohl das Fehlen einer positiven Kontrolle für die Glukokortikoidrezeptorwirkung in Gegenwart von CHX die Beweiskraft des Cykloheximidexperiments schmälert, könnte ein durch Dex induzierter Transkriptionsfaktor die Akkumulation der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA vermitteln oder zumindest an ihr beteiligt sein.



**Abb. 10: Dexamethason-induzierte Akkumulation von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA.** Nicht oder 30 min mit Cykloheximid (CHX) vorbehandelte S49.1-Zellen wurden nicht bzw. unterschiedlich lange mit 0,1 μM Dexamethason behandelt und poly(A)<sup>+</sup>-mRNA isoliert. Mit je 5 μg mRNA pro Punkt wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt und die Filter mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten für p27 hybridisiert. Zur Quantifizierung wurden die Filter mit einer cDNA-Probe des humanen Elongationsfaktors 1α (hef-1) hybridisiert. Pfeile weisen auf die entsprechenden spezifischen Signale hin.

Nachdem Glukokortikoide außer der Stabilität des p27<sup>Kip1</sup>-Proteins auch die Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Transkript deutlich erhöhen, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der mRNA-

Akkumulation. Denkbar ist ein Einfluß auf die Promotoraktivität von p27<sup>Kip1</sup> (transkriptioneller Mechanismus) oder auf die Stabilität der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA (posttranskriptioneller Mechanismus). Für den schlüssigen Nachweis eines transkriptionellen Mechanismus der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion wurde im folgenden die Induzierbarkeit des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors durch Glukokortikoide untersucht.

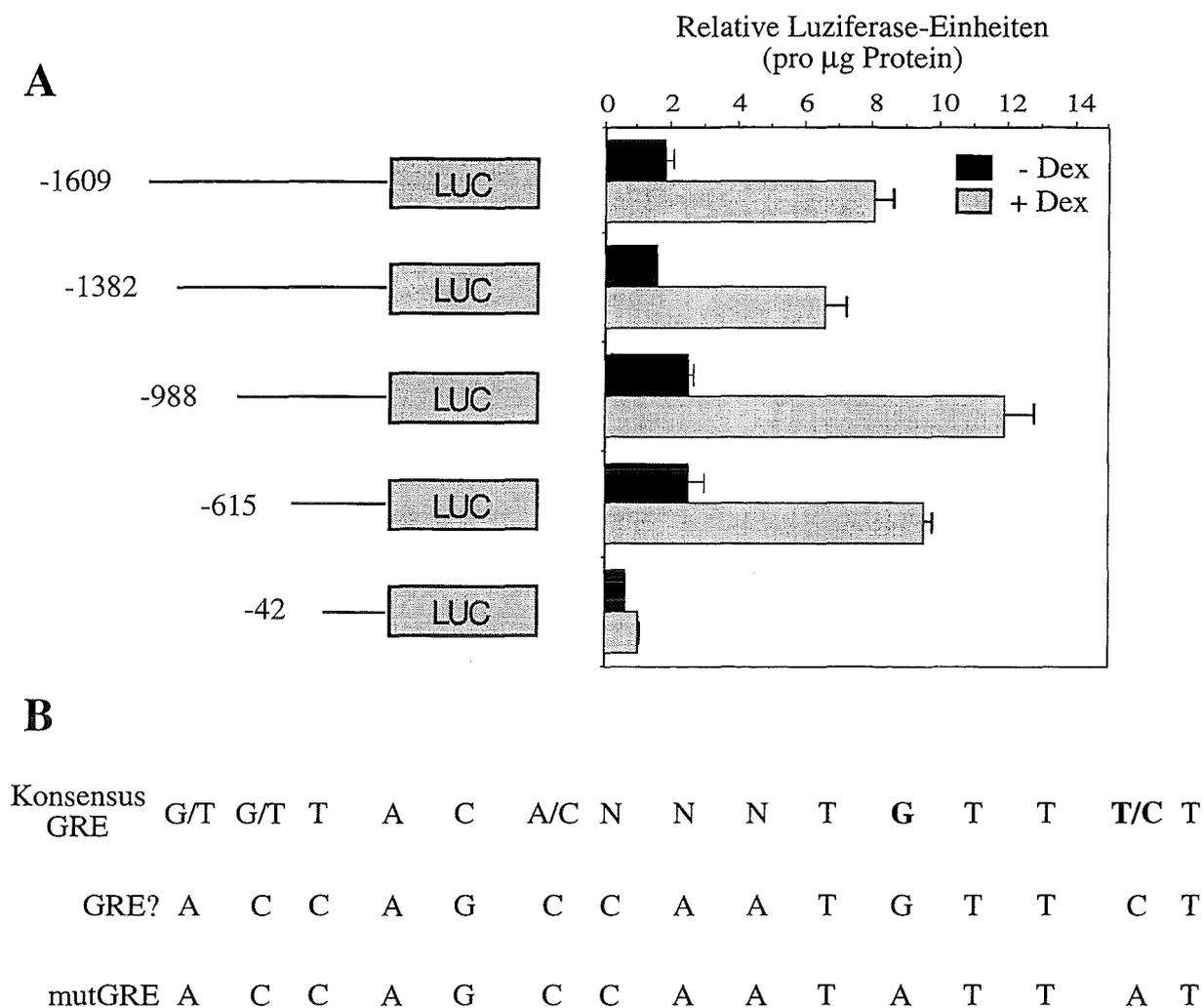
### **Dexamethason aktiviert den p27<sup>Kip1</sup>-Promotor**

Die zuvor geschilderten Experimente zeigten, daß Dexamethason-(Dex)-Behandlung die Menge von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA induziert. Diese Induktion könnte durch Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors erfolgen. Eine etwa 2 kbp große Promotorregion des Maus-p27-Gens wurde kürzlich isoliert und Reportergenkonstrukte hergestellt (Kwon et al., 1997). Die Promotorregion enthält keine TATA-Box, aber potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie C/EBP, Sp1, CREB/ATF-1, Myb und NF $\kappa$ B (Kwon et al., 1996). Zudem befindet sich an der Position -463 bis -446 eine potentielle Bindestelle für den aktivierten Glukokortikoidrezeptor (Abb. 11B, Carson-Jurica et al., 1990). Um den Einfluß von Hormon auf die Aktivität des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors zu bestimmen, wurden S49.1-Zellen transient mit Luziferasereportergen transfiziert, die von verschiedenen Deletionen des Maus-p27<sup>Kip1</sup>-Promotors kontrolliert werden (Abb. 11A, links) und deren Induzierbarkeit durch Dex getestet. Abbildung 11A, rechts faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Dex-Behandlung von transfizierten S49.1-Zellen führte zu einer deutlichen Aktivierung aller Reportergenkonstrukte, mit Ausnahme von p27GL-42. Die Konstrukte p27GL-1609, p27GL-1382, p27GL-988 und p27GL-615 sind alle etwa vierfach induzierbar. Die deutliche Abnahme der Induzierbarkeit des Konstruktes p27GL-42 um mehr als 50 % deutet auf eine mögliche Funktion der halbseitigen Rezeptorbindestelle an Position -463 hin. Die basale Aktivität von p27GL-42 ist im Vergleich zu den anderen Konstrukten deutlich erniedrigt. Dies bedeutet, daß von dem Promotorbereich, wo Dex wirkt, auch ein Großteil der Basalexpression von p27<sup>Kip1</sup> abhängt.

Wenn die Sequenz ein auf Glukokortikoide reagierendes Element (GRE) ist, dann sollte ein kleinerer Bereich des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors, der das potentielle GRE enthält, als Enhancerelement Glukokortikoid-Aktivierung eines heterologen Promotors vermitteln können.

## Ergebnisse



**Abb. 11: Induzierbarkeit von p27<sup>Kip1</sup>-Promotorkonstrukten durch Dexamethason.** A. S49.1-Zellen wurden mit den angegebenen p27-Promotorkonstrukten nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert, 24 h mit 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason behandelt und die Luziferase-Aktivität der Hälfte des Extraktes (max. 100  $\mu\text{l}$ ) bestimmt. Ausgewertet wurden unabhängige (mind. 3 pro Punkt) Experimente und als gemessene Luziferase-Einheiten pro  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt und den Standardabweichungen angegeben. B. GRE (auf Glukokortikoide reagierendes Element) von MMTV (MMTV-GRE) im Vergleich zum vermutlichen GRE im p27-Promotor als Wildtyp-(GRE?)- und mutierte (mutGRE) Sequenz.

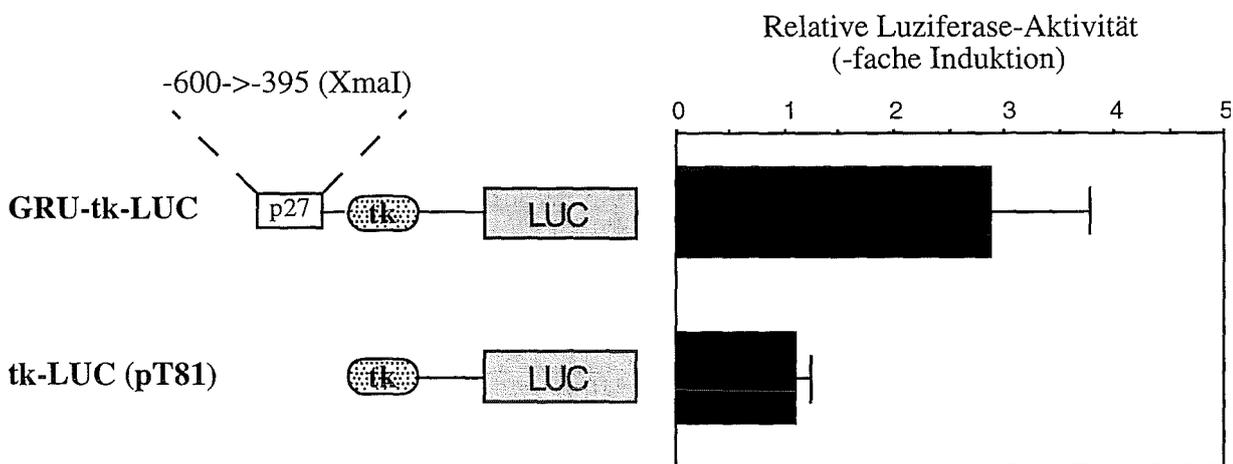
## Der Bereich von -600 bis -395 im p27<sup>Kip1</sup>-Promotor vermittelt Hormoninduzierbarkeit

Um den Beitrag der potentiellen Glukokortikoidrezeptor-Bindestelle von -463 bis -446 zur Hormoninduktion des p27<sup>Kip1</sup> zu überprüfen, wurde der Bereich von -600 bis -395 durch XmaI-Restriktionsverdau isoliert und in die XmaI-Klonierungsstelle des pT81-Vektors ligiert. Der pT81-Vektor exprimiert das Luziferasereportergen unter der Kontrolle eines minimalen Thymidinkinase-(tk)-Promotors. Durch Restriktionsverdau wurde die korrekte Insertion des Fragments überprüft.

Tatsächlich war das klonierte Reportergenkonstrukt GRU-("Glucocorticoid responsive unit)-tk-LUC nach Transfektion in S49.1-Zellen durch Dexamethason (Dex) aktivierbar. Dex-Behandlung führte, im Vergleich zu nicht behandelten Zellen, zu einer etwa 2,5- bis 3,5-fachen Induktion der Reportergenaktivität (Abb. 12). Die Transfektion von pT81 zeigte, daß der tk-Promotor alleine nicht signifikant durch Hormon aktiviert wird (Abb. 12; tk-LUC).

Der etwa 200 bp umspannende Bereich des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors, der die potentielle Bindestelle für den aktivierten GR enthält, kann demnach in einem heterologen Promotorkontext Aktivierbarkeit durch Glukokortikoide vermitteln und ist daher sehr wahrscheinlich eine Zielsequenz der Glukokortikoidwirkung.

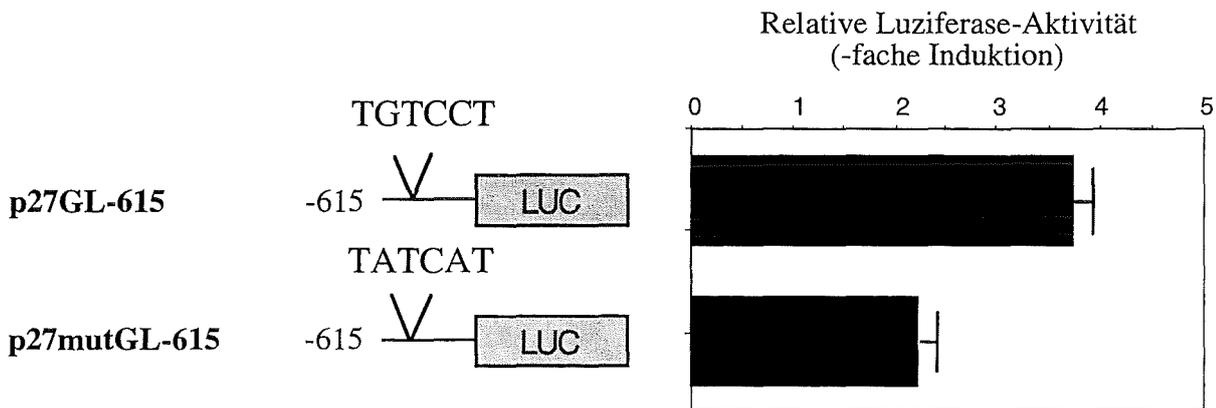
Um die Funktionalität des potentiellen GREs im p27<sup>Kip1</sup>-Promotors zu überprüfen, wurde im weiteren die Sequenz im Kontext des p27GL-615-Reporters durch Punktmutationen zerstört und die Aktivierbarkeit durch Hormon überprüft.



**Abb. 12: Identifikation eines GRUs im p27<sup>Kip1</sup>-Promotor.** S49.1-Zellen wurden mit den angegebenen tk-Promotorkonstrukten transfiziert, 24 h mit 0,1 µM Dexamethason behandelt und die Luziferaseaktivität bestimmt. Ausgewertet wurden unabhängige Experimente (mind. 3 pro Punkt) und als Verhältnis der aus behandelten und unbehandelten Zellen gemessenen Luziferaseeinheiten mit Angabe der Standardabweichungen dargestellt.

## Zerstörung des hormonreagierenden Elements im p27<sup>Kip1</sup>-Promotor verringert die Induzierbarkeit durch Dexamethason

Der Beitrag des vermutlichen, auf Glukokortikoide reagierenden Elements (GRE), zur Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors durch Hormon, läßt sich zeigen, indem man es zerstört und den mutierten Promotor auf Induzierbarkeit durch Dexamethason (Dex) testet. Dazu wurde eine PCR-Mutagenese mit dem p27GL-615-Konstrukt durchgeführt und das Halbseitenmotiv durch Austausch von zwei für die Bindung des aktivierten Glukokortikoidrezeptors essentiellen Nukleotide zerstört (Abb. 11B). Die so mutierte Sequenz kann in Gelretardationsanalysen, im Gegensatz zur Wildtyp-Sequenz, nicht mehr mit einer Konsensussequenz (palindromisches GRE) um die Bindung des Glukokortikoidrezeptors (GR) konkurrieren (Jean Schneikert, IGEN, persönliche Mitteilung). Das mutierte p27GL-615-Konstrukt erwies sich als deutlich weniger (40 %) induzierbar als das Wildtyp-Konstrukt (Abb. 13, rechts). Die Basalaktivität des Promotors ist von der Mutation unbeeinträchtigt.



**Abb. 13: P27-Promotorsequenz von Position -463 bis -446 trägt zur Hormonaktivierung bei.** S49.1-Zellen wurden mit einem Wildtyp- oder mutierten p27GL-615 durch die DEAE-Methode transient transfiziert, 4 h später mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelt und nach 14 h für Luciferase-Assays geerntet. Angegeben ist die Halbsitensequenz vom Wildtyp- und mutierten p27-Reporterkonstrukt. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse von unabhängigen Experimenten (mind. 3 pro Punkt) und als Verhältnis der aus behandelten und unbehandelten Zellen gemessenen Luciferaseeinheiten mit Angabe der Standardabweichungen.

Die verbleibende Induzierbarkeit (etwa 2,3-fach) ist nahe der des kleinsten Promotor-Konstrukts p27GL-42 (etwa 1,8-fach, Abb. 12) und kann im Moment nicht abschließend erklärt werden. Denkbar sind schwache positive Effekte auf die verbliebenen Sequenzelemente im mutierten p27GL-615-Konstrukt (potentielle C/EBP- und Sp1-Bindestellen) oder noch unbekannte auf Dex reagierende Elemente im p27GL-42-Konstrukt.

Diese Ergebnisse sind dennoch starke Belege für die Beteiligung des GREs bei der Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors durch Glukokortikoide. Unterstützt durch die Gelretardations-Analysen (Jean Schneikert, IGEN) kann man annehmen, daß das GRE an Position -463 -> -446 eine

funktionelle Bindesequenz für den aktivierten Glukokortikoidrezeptor ist und zur Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors durch Glukokortikoide beiträgt.

Zusammenfassend scheint die positive Regulation der p27<sup>Kip1</sup>-Expression durch zwei Mechanismen zu erfolgen: Einmal durch Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors und zusätzlich durch einen posttranslationalen Mechanismus, der die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge weiter akkumulieren läßt.

Die Ähnlichkeit des p27<sup>Kip1</sup>-GREs mit der Konsensussequenz für GREs läßt eine Induktion des Promotors durch Bindung des aktivierten Glukokortikoidrezeptor an dieses Element vermuten. Wenn dies der Fall ist, dann sollten Glukokortikoidrezeptoren ohne Transaktivierungsfunktion die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge nicht mehr induzieren können. Es wurde daher versucht, durch Verwendung von Glukokortikoidrezeptor-Mutanten herauszufinden, ob die genaktivierenden oder genreprimierenden Funktionen des GR für die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion und den Zellzyklusblock verantwortlich sind.

### **Welche Funktionen des Glukokortikoidrezeptors sind für den Zellzyklusblock verantwortlich?**

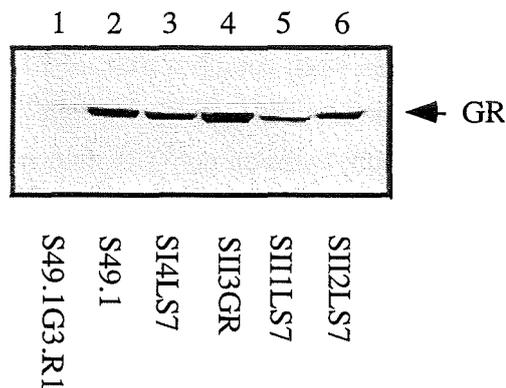
Um die Beteiligung von Transaktivierung und Transrepression durch den Glukokortikoidrezeptor (GR) beim Zellzyklusblock zu bestimmen, sind GR-Mutanten geeignet, die keine genaktivierenden, aber immer noch genreprimierende Funktionen haben.

Dies wurde durch stabile Expression der DNA-Binde-Mutante LS7 in GR-negativen Zellen versucht. Die LS7-Mutante bindet nicht mehr an ein GRE und hat kaum noch genaktivierende Eigenschaften (Helmberg et al., 1994). Die Zelllinie, die für die stabile Transfektion von Rezeptormutanten ausgesucht wurde, ist die Maus-Thymomlinie S49.1G3.R1 (Gehring et al., 1982). Sie wurde durch Mutagenese und anschließender Selektion auf Wachstum in Anwesenheit von Dexamethason (Dex) etabliert. Die Analyse der Zelllinie ergab eine sehr geringe Expression eines mutierten Glukokortikoidrezeptors und einen resistenten Phänotyp gegenüber Glukokortikoid-Behandlung (Gehring et al., 1982).

Die stabile Expression von Wildtyp- und mutiertem Glukokortikoidrezeptor erfolgte durch Infektion von S49.1G3.R1-Zellen mit für die Rezeptoren kodierenden Sequenzen enthaltenden retroviralen Partikeln. Dazu mußten zunächst Viruspartikel-produzierende Zelllinien (Produzentenlinie, engl. producer line) mit Hilfe des  $\Omega$ E-Systems (Morgenstern & Land, 1990) etabliert werden. Die  $\Omega$ E-Zelllinie exprimiert retrovirale Proteine, die für Aufbau und Verpackung viraler Partikel, Infektion von Zellen und reverse Transkription viraler RNAs notwendig sind. Die  $\Omega$ E-Zellen produzieren erst dann virale RNA-haltige Partikel, wenn sie mit DNAs transfiziert sind, die RNAs mit einer retroviralen Verpackungssequenz transkribieren. Dies geschieht im  $\Omega$ E-System durch stabile Transfektion mit dem retroviralen Vektor pBABE (Morgenstern & Land, 1990). pBABE transkribiert unter der Kontrolle von zwei Promotoren eine Fusions-RNA, die für einen Selektionsmarker (z.B. bei pBABE-Puro für Puromycin) codiert und eine Verpackungssequenz enthält. Zusätzlich ermöglicht eine Klonierungsstelle im

## Ergebnisse

Vektor die Insertion, Transkription und Translation von cDNAs. Durch Insertion von Rattenwildtyp- und LS7-Mutantenrezeptor-cDNA in pBABE-Puro wurden die Vektoren pBGR und pBLS7 hergestellt und in  $\Omega$ E-Zellen durch die Kalzium-Phosphatmethode transfiziert. Nach etwa drei Wochen Selektion in puromycinhaltigem Medium wurden Einzelklone isoliert, vermehrt und durch Immunoblot-Analyse auf Expression von Glukokortikoid-Rezeptor getestet. Je eine Wildtyp- bzw. LS7-Rezeptor exprimierende Produzenten-Zelllinie wurde zur Infektion von S49.1G3.R1-Zellen verwendet. Die Infektion der S49.1G3.R1-Zellen erfolgte durch Kokultur mit der Produzentenzelllinie für eine Woche. Die stabilen puromycinresistenten Pools wurden anschließend zu klonalen Linien vereinzelt, vermehrt und durch Immunoblotanalyse die Expression von Wildtyp- und LS7-Glukokortikoidrezeptor bestimmt. Es wurde ein Klon als positiv für Wildtyp und drei für LS7-Mutante identifiziert (Abb. 14). Die stabilen Zelllinien exprimieren den Glukokortikoidrezeptor deutlich stärker als die nicht infizierten S49.1G3.R1-Zellen und vergleichbar zu Wildtyp-S49.1-Zellen (Abb. 14, Spuren 3 bis 6 im Vergleich zu Spuren 1 und 2). Die Rezeptormenge der LS7-exprimierenden Zelllinie SII1LS7 scheint von allen Klonen die geringste zu sein (Abb. 14, Spur 5). Um die Funktionalität der stabil exprimierten Rezeptoren zu testen, wurde als nächstes ihr Transaktivierungspotential in Reporteranalysen bestimmt.



**Abb. 14: Stabile Expression von Wildtyp und LS7-Mutante des Glukokortikoidrezeptors in S49.1G3.R1-Zellen.** Je 200  $\mu$ g Proteinextrakt von S49.1-Zellen, S49.1G3.R1-Zellen und stabilen Puromycinresistenten Klonen wurden durch 10 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Immunoblotanalyse mit gegen Maus- und Ratten-GR gerichteten Antikörper auf GR-Expression getestet. Gezeigt ist eine Zusammenfassung der Wildtyp und LS7-Mutante exprimierenden Klone. Der Pfeil kennzeichnet das für den GR spezifische Signal.

## **Transaktivierung und Transrepression durch die Glukokortikoidrezeptor-Mutante LS7 in S49.1G3.R1**

Zunächst wurde die Transaktivierung des GR in den stabilen Zelllinien getestet. Dazu wurden die Wildtyp- und LS7-GR exprimierenden Klone mit einem glukokortikoidaktivierbaren Reporter gen transfiziert. Dieses Reporterkonstrukt besteht aus dem Luziferasegen unter der Kontrolle des Maus-Mamma-Tumovirus (MMTV)-Promotors (pHCwt-LUC; Cato et al., 1988). Nach Transfektion und 24 Stunden Dexamethason-(Dex)-Behandlung wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität der einzelnen Ansätze bestimmt.

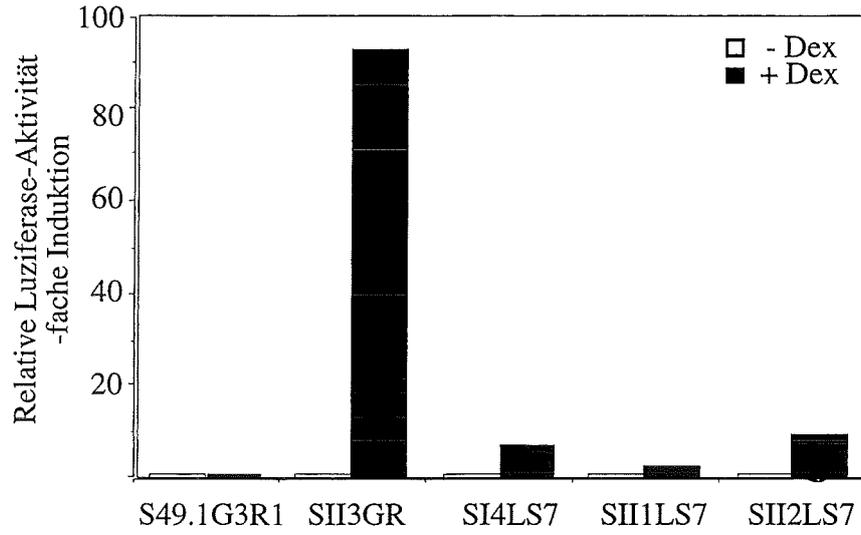
Die gemessene Luziferaseaktivität des Dex-behandelten Wildtyp-GR exprimierenden Klons SII3GR war im Vergleich zu unbehandelten Zellen um etwa 90-fach gesteigert, während Dex-Behandlung den pHCwt-LUC-Reporter in den LS7-exprimierenden Klonen kaum aktivierte (Abb. 15A). Das Aktivierungspotential der LS7-exprimierenden Klone ist etwa 10 bis 20 % des Wildtyp-GR-Klons SII3GR (Abb. 15C). Hormonbehandlung der GR-negativen Zelllinie S49.1G3.R1 führte zu keiner Aktivierung des Reporters.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die LS7-exprimierenden Klone einen deutlichen Transaktivierungsdefekt haben. Um zu überprüfen, ob diese Klone überhaupt funktionelle Rezeptoren exprimieren, wurde eine andere Eigenschaft getestet, die Transrepression durch den GR.

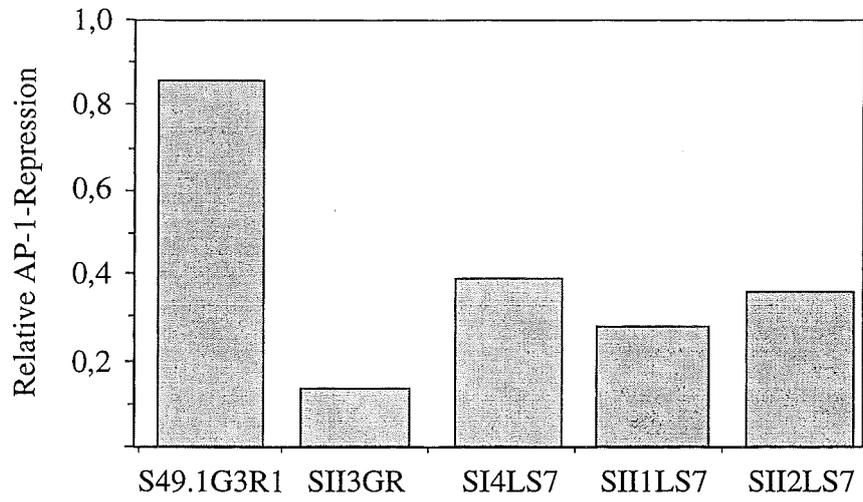
**Abb. 15 (nächste Seite): Transaktivierung und Transrepression in Wildtyp- und LS7-Mutante-rekonstituierten Zelllinien.** A. S49.1G3.R1-Zellen und stabile Klone wurden mittels der DEAE-Dextran-Methode mit dem glukokortikoidaktivierbaren pHCwt-LUC-Reporter transfiziert und 6 h später mit 0,1  $\mu$ M Dex induziert. Nach etwa 24 h wurden die Zellen geerntet und Luziferase-Assays durchgeführt. Die erhaltenen Luziferase-Einheiten in Dex-behandelten Zellen wurden als Vielfaches der nicht behandelten angegeben. B. S49.1G3.R1-Zellen und stabile Klone wurden mittels der DEAE-Dextran-Methode mit dem AP-1-induzierbaren Reporter 5xTRE-tk-CAT transfiziert und 16 h später mit 60 ng/ml TPA, in An- oder Abwesenheit von 0,1  $\mu$ M Dex, behandelt und nach weiteren 24 h für CAT-Assays geerntet. Die Graphik gibt die relative AP-1-Aktivität als Verhältnis von Dex-behandelter zu nicht behandelter TPA-induzierter AP-1-Aktivität an. C. Vergleich der Transaktivierungs- und Transrepressionseigenschaften von S49.1G3.R1-Zellen und stabilen Zelllinien; angegeben sind die Aktivitäten der Zelllinien im Verhältnis zum mit Wildtyp-GR stabil transfizierten Klon SII3GR in Prozent.

Ergebnisse

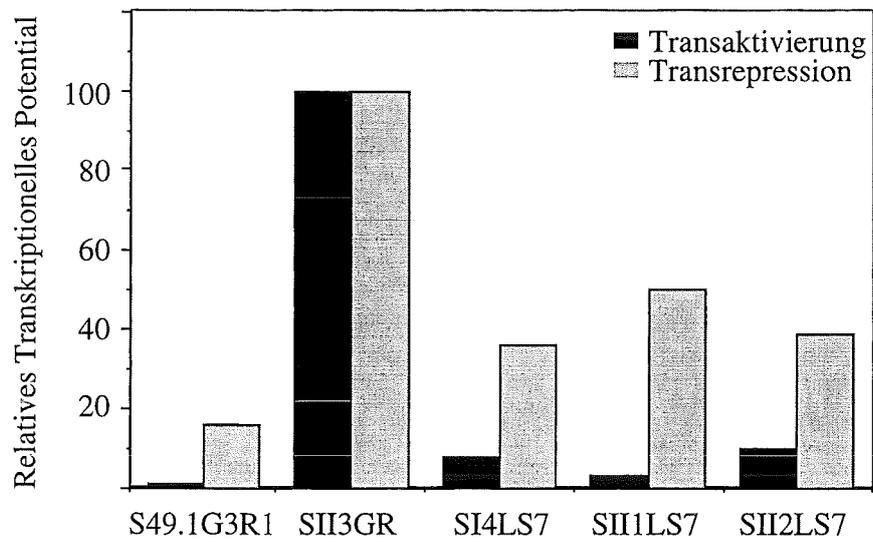
A



B



C



Die am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch den aktivierten Glukokortikoidrezeptor (GR) reprimiert wird, sind AP-1 und NF- $\kappa$ B. Beides sind homo- oder heterodimere Komplexe, die sich aus Mitgliedern der AP-1- bzw. NF- $\kappa$ B/Rel-Familie zusammensetzen (Angel, 1994; Wulczyn et al., 1996).

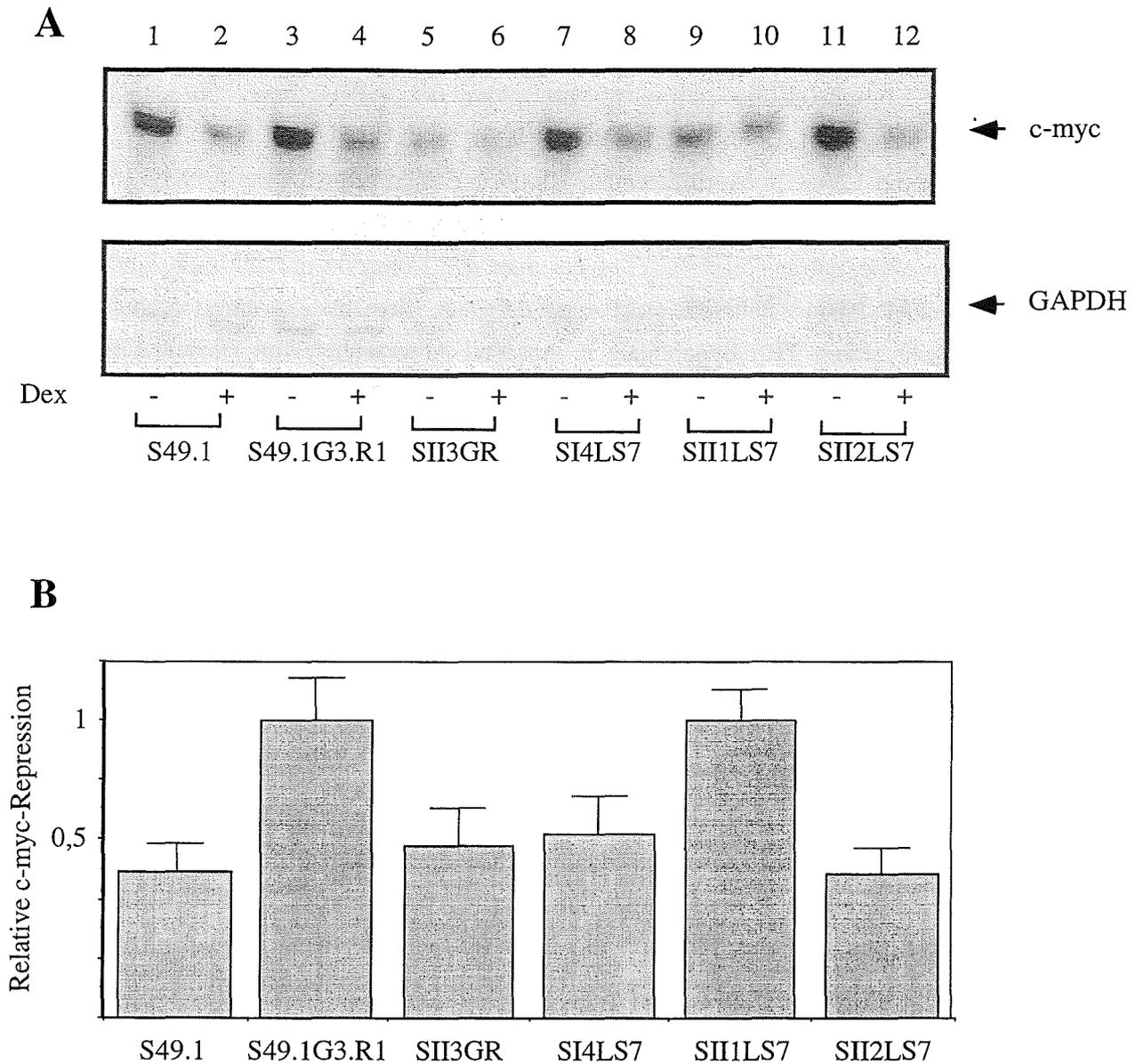
Die Wildtyp- und LS7-GR exprimierenden Klone und nicht transfizierte S49.1G3.R1-Zellen wurden zunächst mit dem AP-1-abhängigen Reporter gen 5xTRE-tk-CAT, welches das Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Gen unter der Kontrolle der fünffach hintereinander angeordneten AP-1-Bindestelle TRE (TPA reagierendes Element) exprimiert, transfiziert und Reporteraktivität durch TPA-Behandlung in An- und Abwesenheit von Dexamethason (Dex) induziert. 24 Stunden nach Behandlung wurde die CAT-Aktivität der geernteten Extrakte bestimmt. Die TPA-induzierte AP-1-Aktivität wird im Gegensatz zu nicht transfizierten S49.1G3.R1-Zellen in allen Klonen effektiv durch Dex gehemmt (Abb. 15B). Die Repression in SII3GR ist etwa zweimal so stark wie in den LS7-GR exprimierenden Zelllinien (Abb. 15B). Dies verdeutlicht, daß im Unterschied zur Transaktivierung, in allen LS7-transfizierten Klonen AP-1-Aktivität effektiv durch Dex gehemmt wird (Abb. 15B).

Die Repression NF $\kappa$ B-abhängiger Reporteraktivität durch Dex konnte in den Wildtyp- und LS7-GR exprimierenden Klonen nicht überprüft werden, da keine NF- $\kappa$ B-Aktivität induzierbar war (nicht gezeigte eigene Daten). Dies scheint eine Besonderheit von S49.1G3.R1-Zellen und den von ihnen abgeleiteten Zelllinien zu sein, da in S49.1-Zellen der NF- $\kappa$ B-abhängige Reporter durch TPA aktivierbar ist und diese Aktivierung in Gegenwart von Dex reprimiert wird. Die Ursache dafür könnte durch einen Defekt im induzierbaren Abbau des Inhibitorproteins von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, erklärt werden, denn der TPA-induzierte Abbau von I $\kappa$ B in S49.1-Zellen findet in S49.1G3.R1-Zellen und den Wildtyp- und LS7-GR exprimierenden Klonen nicht statt. Um dennoch einen Hinweis auf die Repression von NF- $\kappa$ B-Aktivität zu bekommen, wurde in den Klonen die Hemmung der Expression des durch NF- $\kappa$ B regulierten Gens c-myc (Wu et al., 1996 I und II) überprüft.

Dazu wurden Northern-Blot-Analysen mit den verschiedenen S49.1-Zelllinien durchgeführt und die c-myc-Expression in An- und Abwesenheit von Dex bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Expression von c-myc in allen getesteten Zelllinien, außer in den GR-negativen S49.1G3.R1-Zellen und dem LS7-exprimierenden Klon SIII1LS7 (Abb. 16, Spur 3 und 4, sowie Spur 9 und 10), nach 8 Stunden Hormonbehandlung deutlich vermindert ist (Abb. 16, vergleiche Spuren 1 und 2, 5 und 6, 7 und 8, sowie 11 und 12). Die Eigenschaft des Klons SIII1LS7 die Expression von c-myc nicht zu beeinflussen, obwohl AP-1-Aktivität effizient gehemmt wurde (Abb. 15B/C), könnte durch die, im Vergleich zu den anderen Klonen, etwas geringere LS7-Expression erklärt werden (Abb. 14).

## Ergebnisse



**Abb. 16: Hemmung der c-myc-Expression durch Dexamethason.** **A.** Northern-Blot-Analyse mit 5 µg poly(A)<sup>+</sup>-mRNA aus nicht oder 8 h mit 0,1 µM Dex behandelten Kulturen verschiedener Zelllinien wurde durchgeführt, die Filter mit <sup>32</sup>P-markiertem ClaI/EcoRI-cDNA-Fragment von c-myc hybridisiert und gegen einen Film exponiert. Zur Quantifizierung und Ladekontrolle wurde ein PstI-Fragment der GAPDH-cDNA verwendet. Die Pfeile deuten auf die für c-myc und GAPDH spezifischen Signale. **B.** Statistische Zusammenfassung der c-myc-Repression durch Dex von je mind. drei unabhängigen Experimenten, als Verhältnis der mittels Phosphorimager bestimmten Signalstärken in Gegenwart von Dex zu Signalstärken unbehandelter Ansätze.

Da in den Reporteranalysen mit den stabil exprimierenden S49.1G3.R1-Zellen bestätigt wurde, daß die LS7-Mutante Transaktivierung und Transrepression dissoziiert und die Expressionsstärken der verschiedenen Rezeptoren in den einzelnen Klonen vergleichbar sind, kann der Beitrag von Transaktivierung und Transrepression bezüglich weiterer Funktionen des Glukokortikoidrezeptors durch Vergleich der Wildtyp-GR und LS7-Mutante exprimierenden Klone untersucht werden.

Um zu klären, ob Transaktivierung oder Transrepression durch den aktivierten GR für den durch Glukokortikoide induzierten Zellzyklusblock verantwortlich sind, wurden im weiteren Zellzyklusanalysen mit den stabil exprimierenden Klonen durchgeführt.

### **Keine Rekonstitution des Zellzyklusblocks in Wildtyp-GR und LS7-Mutante exprimierenden S49.1G3.R1**

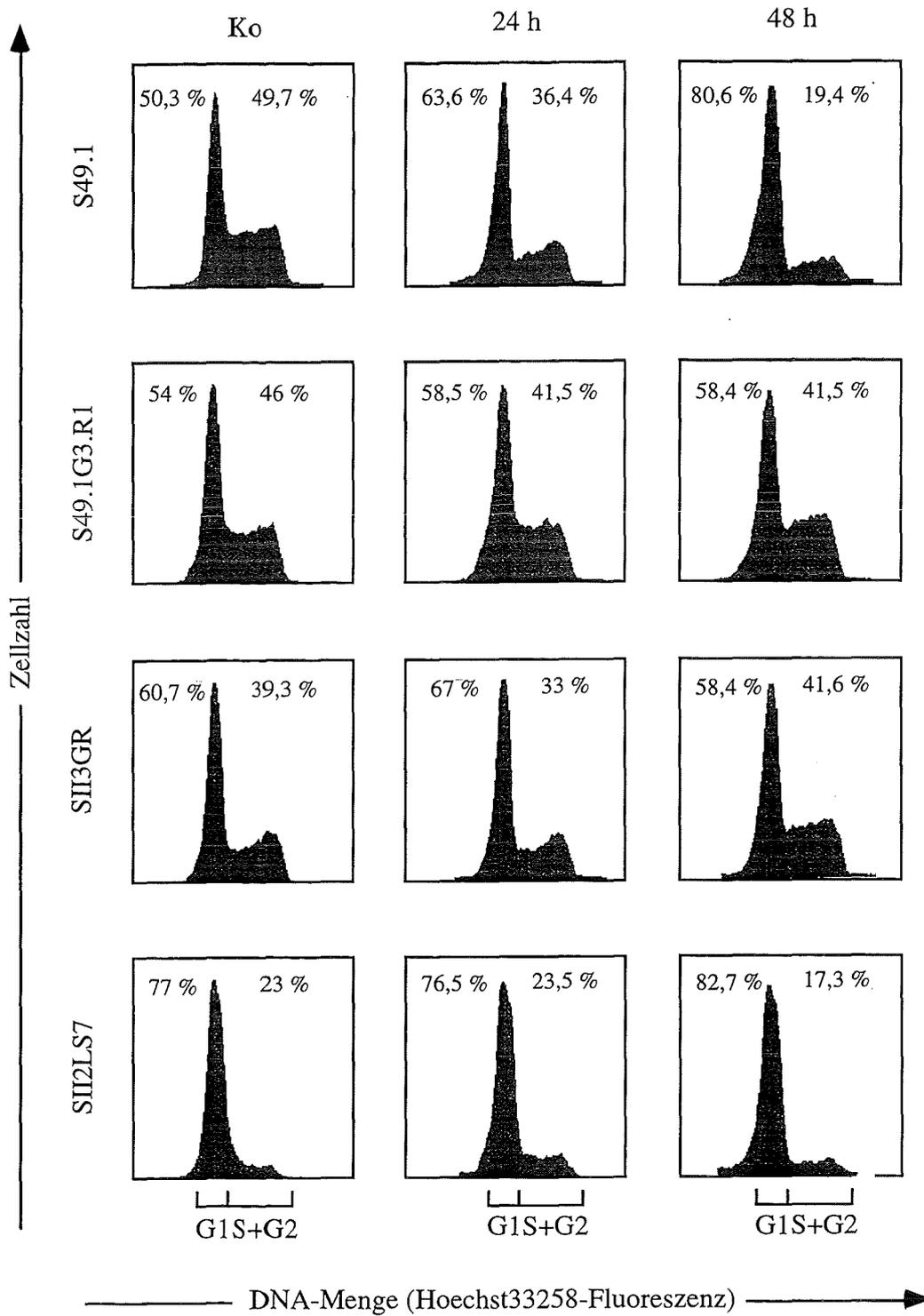
Um den Beitrag von Transaktivierung und Transrepression beim Zellzyklusblock zu bestimmen, wurden die Klone SII3GR und SII2LS7 verschieden lange mit Dexamethason (Dex) behandelt und die Zellzyklusverteilung bestimmt. Die Behandlung von S49.1-Zellen erfolgte als positive, die von S49.1G3.R1-Zellen als negative Kontrolle für die Zellzyklusanalyse.

Die DNA-Menge pro Zelle wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst3383 durchflußzytometrisch bestimmt.

Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu S49.1-Zellen, der LS7-exprimierende Klon SII2LS7, keinen Zellzyklusblock nach Dex-Behandlung zeigte (Abb. 17). Sie verhalten sich damit wie nicht transfizierte S49.1G3.R1 (Abb. 17). Genauso verhielt sich der Wildtyp-GR-exprimierende Klon. Obwohl beide Klone transkriptionell aktive Rezeptoren exprimieren, wird durch Dex-Behandlung kein Zellzyklusblock induziert. Dies kann man aber nicht auf die Expression der nur genreprimierenden LS7-Mutante zurückführen, da auch die Hormonbehandlung des Wildtyp-GR exprimierenden Klons SII3GR zu keinem Zellzyklusblock führt.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, daß die Menge der regulatorischen G1-Phaseproteine Zyklin D3 (cyc D3) und p27<sup>Kip1</sup> beim Zellzyklusblock von S49.1-Zellen durch Dex-Behandlung erniedrigt bzw. erhöht wird (Abb. 5 und 6). Um die molekularen Ursachen zu erfahren, warum in den stabil exprimierenden Klonen kein Zellzyklusblock durch Glukokortikoide erfolgt, wurde im Folgenden der Einfluß von Hormonbehandlung auf die Menge von cyc D3 und p27<sup>Kip1</sup> in den stabil exprimierenden Klonen untersucht.

## Ergebnisse



**Abb. 17: Kein Zellzyklus-Block in rekonstituierten Zelllinien.** Die DNA-Menge pro Zelle der angegebenen Zelllinien wurde nach der Hoechst-Methode mit anschließender Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurden unterschiedlich lange mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelte Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert, mit 0,05 % Tween 20 permeabilisiert und die DNA mit 1  $\mu$ g/ml Hoechst33258 gefärbt. Im linken Teil der Abbildung ist jeweils der prozentuale Anteil der Zellen in der G1-, im rechten Teil der prozentuale Anteil der Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus angegeben.

## **Kein Einfluß von Glukokortikoiden auf die Expression von Zellzyklusfaktoren in den rekonstituierten S49.1G3.R1-Zellen**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde in S49.1-Zellen die Repression von Zyklin D3 und die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> durch Dex gezeigt. Wenn Dex-Behandlung von Wildtyp- und Mutantenrezeptor-exprimierenden Klone zu keinem G1-Block führt, sollte dies auf eine fehlende Regulation von Zellzyklus-Faktoren zurückzuführen sein, falls diese Faktoren relevant für den G1/S-Phasenübergang von T-Zellen sind.

Um eine Idee zu bekommen, warum der Zellzyklus in den rekonstituierten Klonen nicht durch Glukokortikoide geblockt wird, wurde daher der Einfluß von Hormonbehandlung auf die Expression der Zellzyklusfaktoren cyc D3 und p27<sup>Kip1</sup> überprüft.

In keiner der getesteten Zelllinien findet eine Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge, wie in S49.1-Zellen durch Dex statt. (Abb. 18, unterer Teil, Spuren 4 bis 12 im Vergleich zu Spuren 1 bis 3). Das in S49.1-Zellen negativ regulierte cyc D3 (Abb. 18, oberer Teil, Spuren 1 bis 3) zeigt in den von S49.1G3.R1-Zellen abgeleiteten Klonen SII3GR und SII2LS7 ebenfalls keine Veränderung der Proteinmenge nach Hormonbehandlung (Abb. 18, oberer Teil, Spuren 4 bis 12). S49.1G3.R1-Zellen, SII3GR und SII2LS7 haben im Vergleich zu unbehandelten S49.1-Zellen eine leicht erhöhte Expression von p27<sup>Kip1</sup>. Die Ursache dafür konnte nicht geklärt werden, aber zumindest die Expression des GR in SII3GR und SII2LS7 kann als Grund ausgeschlossen werden, da auch in nicht transfizierten S49.1G3.R1-Zellen die Expression von p27<sup>Kip1</sup> erhöht ist.

Fazit aus diesen Experimenten ist, daß in den Klonen das Ausbleiben eines "G1-Blocks" nach Dex-Behandlung mit fehlender Regulation der Zellzyklusfaktoren p27<sup>Kip1</sup> und cyc D3 korreliert. Da beide Zellzyklusproteine nicht reguliert werden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, welcher der beiden der entscheidende Faktor beim Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock ist.

Das Ausbleiben eines Zellzyklusblocks nach Glukokortikoid-Behandlung in den Wildtyp-GR und LS7-Mutante exprimierenden Klonen, könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Ausgangszelllinie für die stabile Transfektion, mehr als nur ein funktioneller Glukokortikoidrezeptor fehlt und diese womöglich bei ihrer Generierung zusätzliche Mutationen erworben hat, welche die Zelllinie resistent gegenüber Glukokortikoide machten.

Eine andere Möglichkeit ist, daß die stabil transfizierten Rezeptoren, aus unbekanntem Gründen, generell keine physiologische Aktivität haben. Daher wurde als nächstes die andere physiologische Funktion des GR in T-Zellen, die Induktion von Apoptose, in den Klonen überprüft. Eine interessante Frage ist, ob beide Funktionen des Rezeptors durch den gleichen Mechanismus vermittelt werden, ob die zeitliche Abfolge beider Prozesse in lymphoiden Zellen einer sequentiellen Abfolge voneinander abhängiger Prozesse entspricht, in deren Verlauf zunächst ein Zellzyklusblock und als Folge dessen Apoptose ausgelöst wird.

## Ergebnisse

Wenn dies der Fall ist, sollten die stabil exprimierenden Klone durch Glukokortikoidbehandlung nicht mehr in die Apoptose gehen, da ein Zellzyklusblock nach Hormonbehandlung ausbleibt.

Es wurden daher im weiteren Apoptoseuntersuchungen in den Wildtyp-GR und LS7-Mutante exprimierenden S49.1G3.R1 durchgeführt. Zuvor wurden aber verschiedene Messmethoden für Apoptose etabliert und die morphologischen und biochemischen Merkmale der Glukokortikoid-induzierten Apoptose in S49.1-Zellen bestimmt.

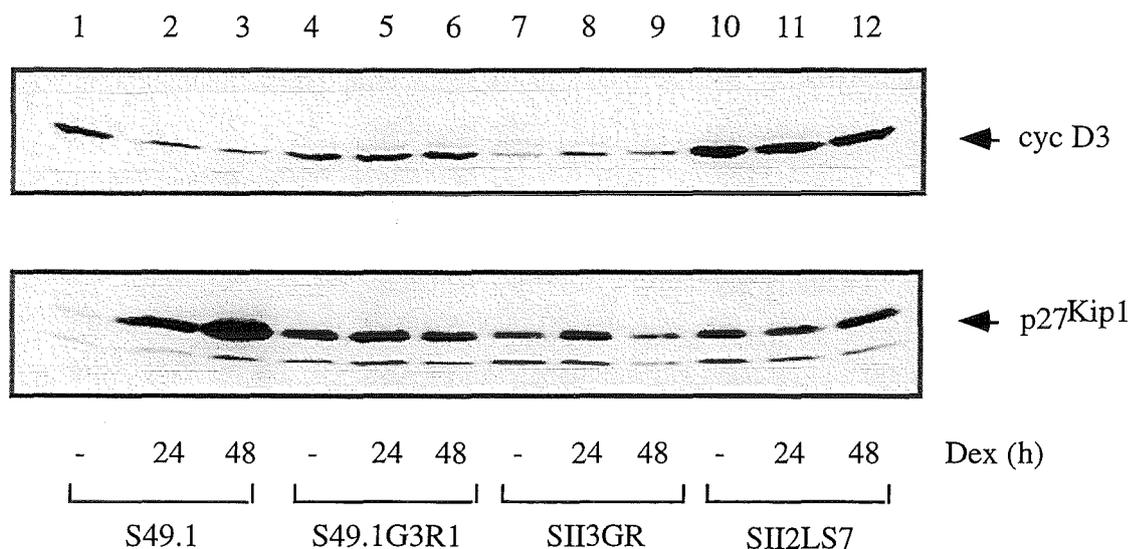


Abb. 18: Keine Regulation von p27<sup>Kip1</sup> und cyclin D3 in Wildtyp-GR und LS7-Mutante-exprimierenden Klonen durch Dexamethason. Immunoblot-Analyse von je 100 µg Proteinextrakt aus nicht bzw. unterschiedlich lange mit 0,1 µM Dex behandelten S49.1-Zellen, S49.1G3.R1-Zellen und den Klonen SII3GR und SII2LS7; spezifische Signale sind durch Pfeile markiert.

## Charakterisierung der Glukokortikoid-induzierten Apoptose in den Thymom-Zelllinien S49.1 und S49.1G3.R1

Die für die Apoptose typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen sind meist die Folge der Aktivität von Caspasen. Dies konnte durch die Verwendung von Caspaseinhibitoren gezeigt werden, die mit den zellulären Substraten der Caspasen um deren aktives Zentrum konkurrieren und so die "Caspase-Kaskade" des apoptotischen Programs blockieren (Nicholson und Thornberry, 1997). Durch solche Experimente wurde klar, daß ein Großteil der apoptotischen Stimuli in die "Caspase-Kaskade" einmündet und die Caspaseaktivitäten Voraussetzung für fast alle apoptotischen Veränderungen von Zellen sind. So hemmen Caspaseinhibitoren die UV- und Dex-induzierte DNA-Fragmentierung und Spaltung von PARP (Polyadenosylribosyl-Polymerase) in Thymocyten.

Diese typischen Merkmale der Apoptose treten auch in S49.1-Zellen auf. Mit bis zu 70 Stunden Dex-behandelten S49.1-Zellen wurde durch Immunoblot-Analyse der Status von PARP bestimmt. Es zeigte sich, daß nach etwa 48 Stunden Dex-Behandlung das größere Spaltprodukt

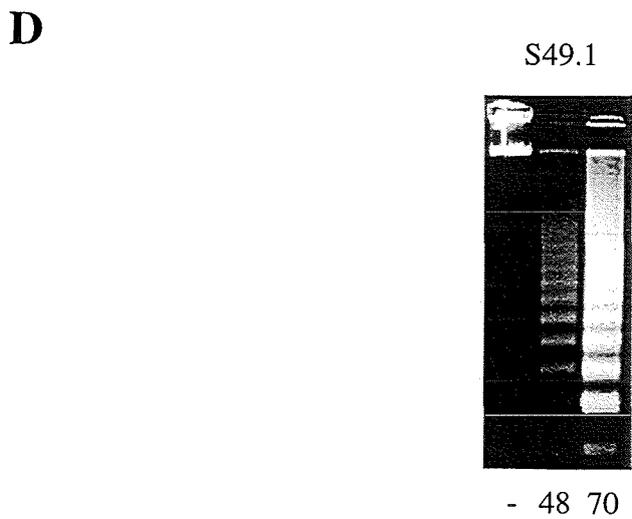
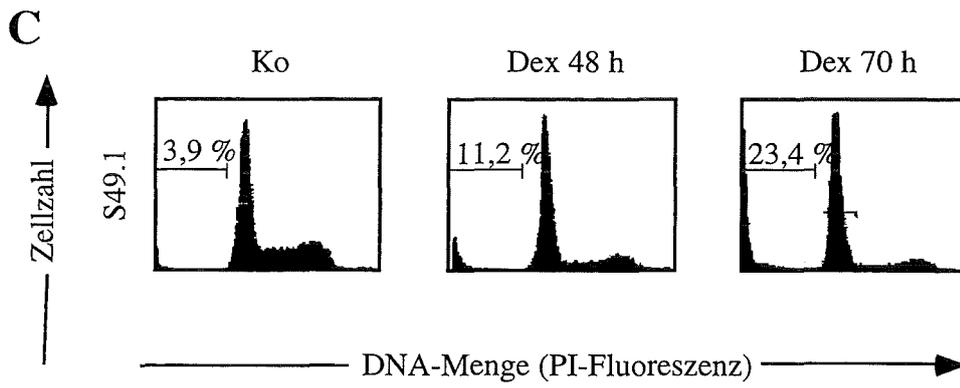
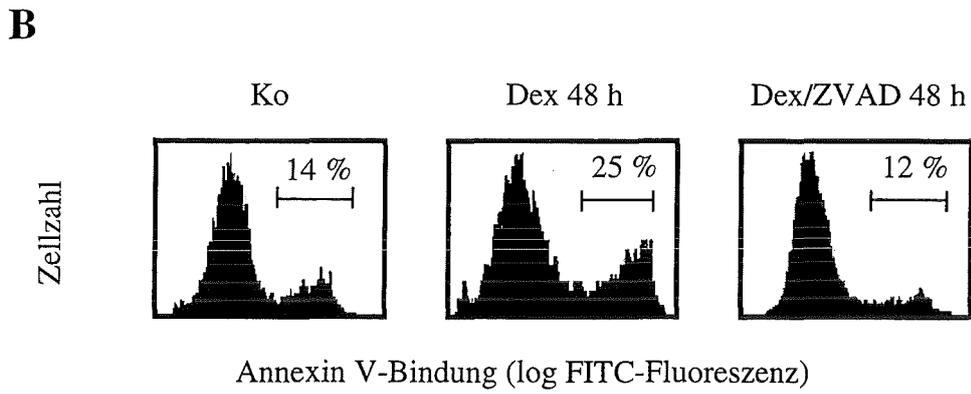
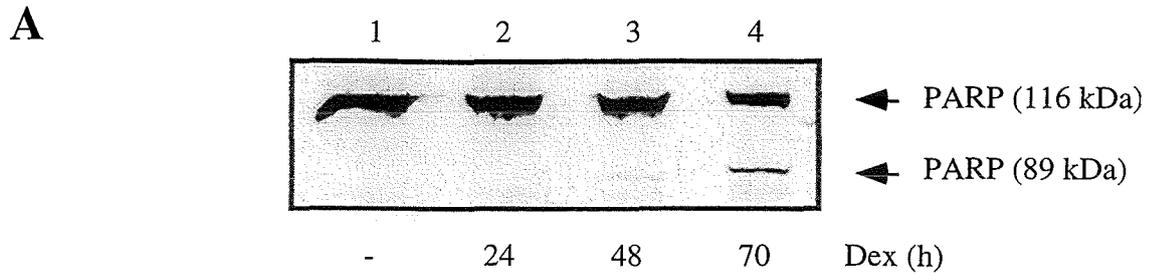
## *Ergebnisse*

von PARP mit einer Molekülgröße von 89 kDa detektiert wird (Abb. 19A, Spur 3) Die Spaltung setzt sich bis 70 Stunden Hormonbehandlung fort (Abb. 19A, Spur 4), was sich auch durch Abnahme des Signals für das nicht gespaltene PARP (116 kDa) zeigt. Da die PARP-Spaltung durch Caspasen erfolgt, ist eine Beteiligung der "Caspase-Kaskade" an der durch Glukokortikoide ausgelösten Apoptose in S49.1-Zellen sehr wahrscheinlich.

Dex-Behandlung von S49.1-Zellen führte auch zur Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin zur Außenseite der Plasmamembran (Abb. 19B). Für die Messung und Quantifizierung dieses Vorgangs, von dem man annimmt, daß er für die Erkennung und anschließende Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen wichtig ist, macht man sich die hochaffine Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin zunutze. Inkubiert man Zellen mit Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V, z.B. mit Fluoro-Isothiocyant (FITC)-Annexin V, dann erfolgt eine verstärkte Bindung des Zellmembran-impermeablen Annexin V-FITC an apoptotische Zellen, die man durch Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflußzytometrie (engl. Fluorescence Cell Activated Sorting (FACS)) quantifizieren kann.

In einem weiteren Experiment führte Dex-Behandlung von S49.1-Zellen zur Aktivierung von Endonukleasen, wie die Messung der DNA-Menge pro Zellkern und der DNA-Fragmentierung zeigt. Dazu wurden S49.1-Zellen 48 bzw. 70 Stunden mit Dex behandelt und anschließend Apoptose durch zwei Methoden bestimmt: mit einem Teil der Zellen wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt, wobei die DNA-Menge fluorometrisch durch Färbung mit Propidiumjodid und anschließender Durchflußzytometrie bestimmt wurde und mit einem anderen Teil der Zellen durch Isolierung fragmentierter DNA und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. In hormonbehandelten S49.1-Zellen isoliert man Zellkerne mit weniger DNA als der für G1-Zellen üblichen ( $< 2N$ , "subG1", Abb. 19C, obere Reihe im Vergleich zur unteren). Im gezeigten Experiment nahm das Signal bei S49.1-Zellen für "subG1-Kerne" von 3,9 % in unbehandelten auf 11,2 % bzw. 23,4 % nach 48 bzw. 70 Stunden Hormon zu. Der Anstieg des "subG1"-Signals geht parallel mit einer verstärkten Isolierung fragmentierter DNA. Spätestens 48 Stunden nach Dex-Behandlung werden DNA-Fragmente einer Länge, die dem Vielfachen der in einem Nukleosom verpackten genomischen DNA (etwa 150 bp) entsprechen, isoliert. (Abb. 19D, linker Teil). Bei der DNA, die in unbehandelten S49.1-Zellen isoliert wurde (Abb. 19D, linker Teil), handelt es sich um hochmolekulare DNA, die abhängig vom Grad der Beschädigung der Kerne, während der Arbeitsprozedur manchmal isoliert wird.

Ergebnisse



**Abb.19 (vorherige Seite): Apoptose in S49.1-Zellen** **A.** Polyadenosylribosyl-Polymerase-(PARP)-Spaltung nach Dex. 100 µg Proteinextrakt aus nicht oder verschieden lange mit 0,1 µM Dex behandelten S49.1-Zellen wurden durch 8 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und PARP durch Immunoblot-Analyse mit spezifischem Antikörper detektiert. Die Signale für die ungespaltete Form (116 kDa) und das größere Spaltprodukt (89 kDa) von PARP sind durch Pfeile gekennzeichnet. **B.** Vermehrte Bindung von Annexin V an Dex-behandelten S49.1-Zellen. Unbehandelte (Ko) bzw. 48 h Dex ohne bzw. mit Caspase-Inhibitor ZVAD behandelte S49.1-Zellen wurden mit Fluoroisothiocyanat (FITC)-gekoppeltem Annexin V (Annexin V-FITC) inkubiert und dessen Bindung durch Durchflußzytometrie quantifiziert. Durch Anwesenheit von Propidiumjodid (PI) während der Analyse, konnten PI-permeable nekrotische Zellen von PI-impermeablen apoptotischen Zellen unterschieden und von der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Die apoptotische FITC-markierte Zellpopulation ist gekennzeichnet und ihr Anteil an der Gesamtpopulation in Prozent angegeben. **C.** Propidiumjodidfärbung mit anschließender Durchflußzytometrie von S49.1-Zellen, die nicht oder unterschiedlich lange mit 0,1 µM Dex behandelt waren. **D.** Aus einem Teil der Zellen von C wurden DNA-Fragmente isoliert, auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt, durch Ethidiumbromid angefärbt und unter UV fotografiert.

Die Experimente zeigten, daß Glukokortikoide in S49.1-Zellen einen Zelltod mit charakteristischen Merkmalen der Apoptose auslösen. Veränderungen in der Lipidverteilung der Plasmamembran, proteolytischer Verdau von zellulären Substraten und Aktivierung von Endonukleasen mit resultierender DNA-Fragmentierung sind eindeutige Hinweise auf apoptotische Prozesse.

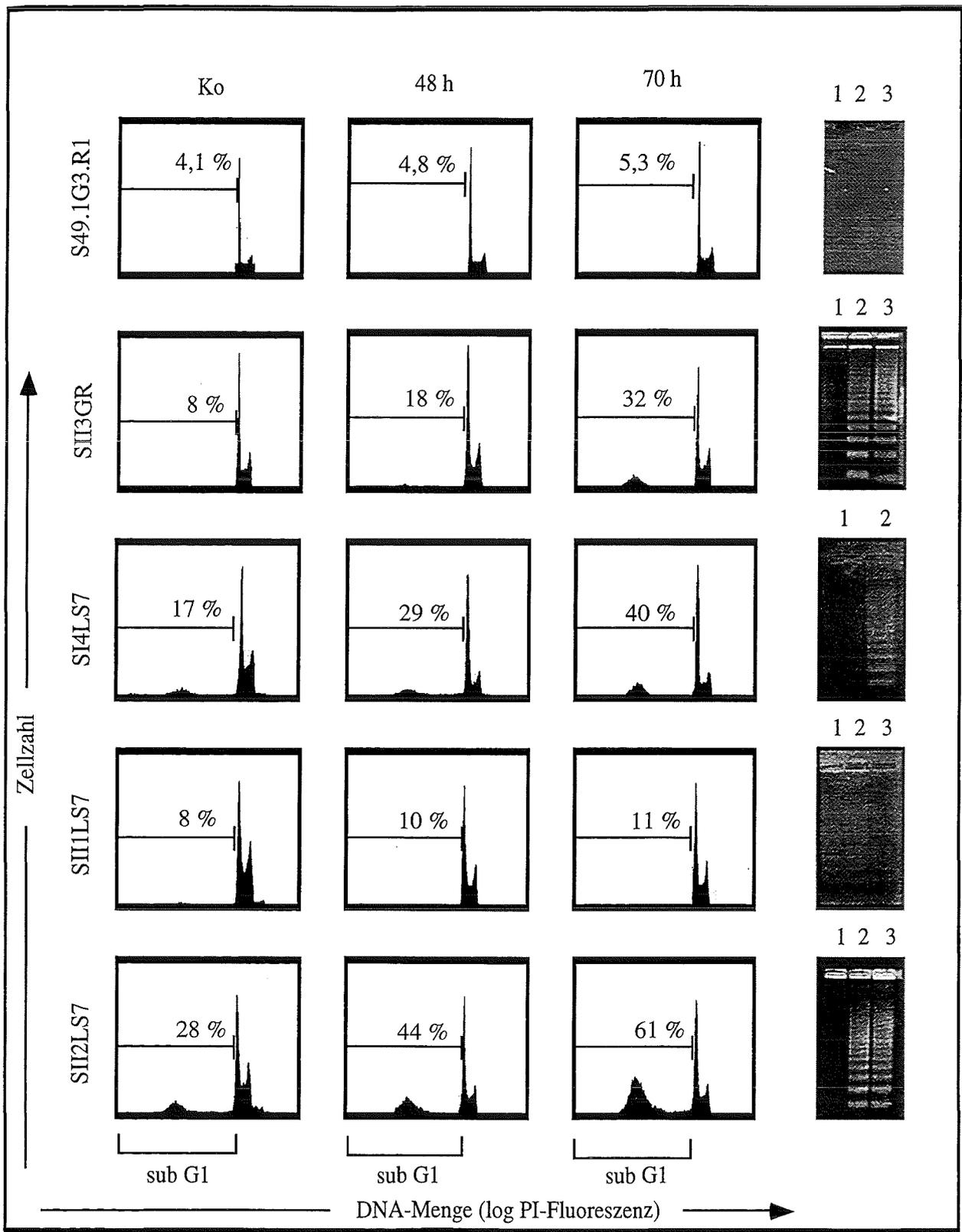
Nach der Charakterisierung der verschiedenen Apoptosismerkmale in S49.1-Zellen, wurde als nächstes Apoptoseinduktion durch Glukokortikoide in den stabil Wildtyp-GR und LS7-Mutante-exprimierenden Klonen untersucht. Zur Bestimmung der Apoptose wurde die Propidiumjodid-Färbung von Kernen und die Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet, da diese Methoden am sensitivsten waren.

### **Die genreprimierenden Eigenschaften des Glukokortikoidrezeptors sind ausreichend für die Apoptose in S49.1G3.R1**

Um zu untersuchen, ob die stabile Transfektion von Wildtyp-Glukokortikoidrezeptor (GR) oder LS7-Mutante, das hormonabhängige apoptotische Programm in den Glukokortikoid-resistenten S49.1G3.R1-Zellen rekonstituiert hat, wurden diese verschieden lange mit Dexamethason (Dex) behandelt und Apoptose durch Propidiumjodidfärbung der DNA, anschließender durchflußzytometrischer Bestimmung des DNA-Gehaltes pro Zellkern und durch Isolierung fragmentierter DNA bestimmt.

Es erwies sich, daß sowohl im Wildtyp-exprimierenden Klon SII3GR, als auch in den LS7-exprimierenden Klonen SI4LS7 und SII2LS7, Apoptose durch Dex-Behandlung induziert wird (Abb. 20). Da in diesen Klonen nach Dex außer dem "sub G1"-Signal auch DNA-Fragmentierung detektiert wurde (Abb. 20, Teilabbildungen rechts), ist das hormoninduzierte apoptotische

Ergebnisse



**Abb. 20 (vorherige Seite): Rekonstitution der Apoptose in stabil exprimierenden S49.1G3.R1: B.** S49.1G3.R1, Wildtyp- und LS7-Mutanten exprimierende Klone wurden nicht bzw. verschieden lange mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelt und die "sub G1"-Population durch Propidiumjodid-Färbung mit anschließender Durchflußzytometrie und DNA-Fragmentierung durch Isolierung fragmentierter DNA mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Programm wiederhergestellt. Nur im LS7-exprimierenden Klon SII1LS7 waren keine apoptotischen Prozesse detektierbar (Abb. 20), weder durch eine Steigerung des "sub G1"-Signals noch durch eine DNA-Fragmentierung (Abb. 20, rechte Teilabbildung).

Das Fazit dieser Apoptoseuntersuchungen ist, daß die hormonabhängige Apoptose, unabhängig von einem Zellzyklusblock, durch stabile Expression von Wildtyp- und LS7 -GR in S49.1G3.R1-Zellen rekonstituiert wird. Dies bedeutet, daß Zellzyklusblock und Apoptose durch verschiedene hormonabhängige Mechanismen ausgelöst werden. Daß, mit der Ausnahme des Klons SII1LS7, alle genaktivierungs-defekten LS7-Klone in die Apoptose gingen, spricht für die Beteiligung der genreprimierenden Eigenschaften des GR bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose.

Die zu einem früheren Zeitpunkt dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der genreprimierenden Eigenschaften der LS7- Klone könnte erklären, warum der Klon SII1LS7 durch Glukokortikoid-Behandlung nicht in die Apoptose geht. Dort wurde gezeigt, daß der Klon SII1LS7, im Gegensatz zu allen anderen LS7-Klonen, die Expression von c-myc nicht reprimieren kann (Abb. 16A/B). Diese Korrelation von c-myc-Repression mit der Apoptose wird durch die bekannte Repression der c-myc-Expression durch Glukokortikoide während der Apoptose anderer T-Zellen (Auphan et al., 1995 ) und die Inhibition der Glukokortikoid-induzierten Apoptose durch c-myc-Überexpression (Thulasi et al., 1993), bestätigt.

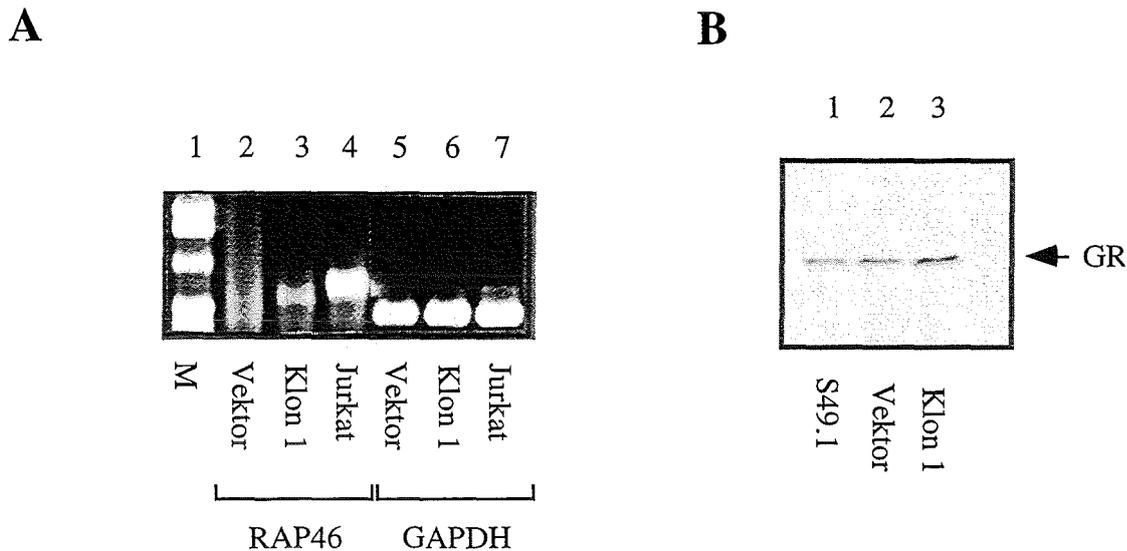
## **Teil 2: RAP46 als negativer Regulator von Glukokortikoidrezeptor-Funktionen**

Die Anzahl von Faktoren, die Apoptose positiv oder negativ regulieren, nimmt bis zum heutigen Zeitpunkt ständig zu. Viele dieser pro- und antiapoptotischen Faktoren werden durch Mitglieder der bcl-2-Genfamilie kodiert. Exemplarische Vertreter sind das antiapoptotische Bcl-2 und das proapoptotische Bax. Die Möglichkeit der bcl-2-Faktoren untereinander Homo- und Heterodimere zu bilden, ist die molekulare Grundlage des überwiegend anerkannten Modells, welches besagt, daß die relative Menge von pro- und antiapoptotischen Faktoren über die Einleitung von Apoptose entscheidet (Chao & Korsmeyer, 1998). Überwiegen antiapoptotische Faktoren, dann werden nach diesem Modell proapoptotische Faktoren durch Heterodimerisierung inaktiviert und Apoptose verhindert, sind proapoptotische Faktoren im Überschuß, dann können diese durch Homodimerisierung, z.B. von Bax, Apoptose einleiten. Die Klonierung von Faktoren, die mit Bcl-2 interagieren, führte nicht nur zur Identifizierung von Bcl-2-Homologen, sondern auch von Faktoren, die keine strukturellen Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Bcl-2-Familie haben. Ein solches Protein ist BAG-1 aus der Maus. BAG-1 interagiert mit einer Reihe von Proteinen, u.a. Bcl-2 und inhibiert, die durch verschiedene Stimuli ausgelöste Apoptose (Takyama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Wang et al., 1996 II). Zum etwa gleichen Zeitpunkt wurde das menschliche Homolog zu BAG-1, RAP46 entdeckt. Das menschliche RAP46 wurde aufgrund seiner Interaktion mit einer Reihe von Steroidrezeptoren, u.a. dem Glukokortikoidrezeptor (GR), identifiziert (Zeiner & Gehring, 1995).

Um herauszufinden, ob RAP46 eine ähnliche Funktion hat wie BAG-1 und die Interaktion mit dem GR physiologisch von Bedeutung ist, wurde der Effekt von RAP46-Expression auf die GR-Funktionen untersucht.

### **RAP46-Expression in S49.1-Zellen**

Die durch Glukokortikoide ausgelöste Apoptose ist eine Funktion des aktivierten Glukokortikoid-Rezeptors (siehe Teil 1 dieser Arbeit). Wenn die Interaktion von RAP46 mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) physiologisch von Bedeutung ist, sollte Überexpression von RAP46 mit der hormoninduzierten Apoptose negativ interferieren. Es wurde daher versucht, RAP46 stabil in der Maus-Thymom-Zelllinie S49.1 zu exprimieren, um den Einfluß auf verschiedene GR-Funktionen zu untersuchen. Dazu wurden S49.1-Zellen mit dem retroviralen Vektor pBABE-Puro, der RAP46-cDNA exprimiert (pBRAP46) und zur Kontrolle mit dem Vektor ohne cDNA (pBABE) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 24 Stunden später in Selektionsmedium umgesetzt und nach etwa drei Wochen der puromycinresistente Pool vereinzelt. Die vermehrten Einzelklone wurden anschließend auf Resistenz gegen Dexamethason (Dex) getestet und genauer charakterisiert.



**Abb. 21: Expression von Glukokortikoidrezeptor und RAP46 in S49.1-Zellen.** A. RT-PCR-Analyse (siehe Methodenteil) von mit "Leervektor"- und RAP46-cDNA stabil transfizierten S49.1-Zellen mit RAP46- und GAPDH-spezifischen Primern und anschließender 2 % Agarose-Gelelektrophorese. Amplifikation von Jurkat-cDNA diente als positive Kontrolle für RAP46-Expression. B. Immunoblot-Analyse von je 100 µg Proteinextrakt der angezeigten Zelllinien mit gegen Glukokortikoidrezeptor (GR) gerichteten Antikörper. Der Pfeil zeigt auf das für den GR spezifisches Signal.

Eine Detektion von RAP46 war durch Western- und Northern-Blot-Analyse aufgrund der schwachen Expression nicht möglich. Erst eine Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) eines stabilen puromycinresistenten Klons mit Oligonukleotid-Primern, die komplementär zu einem 3'-Bereich von RAP46 und BAG-1 und spezifisch für einen 5'-Bereich von RAP46 waren, konnte den Nachweis einer Expression der stabil integrierten cDNA erbringen (Abb. 21A, Spur 3). Das PCR-Produkt entspricht der erwarteten Größe der transfizierten cDNA und dem kleinsten von mindestens zwei Produkten bei Verwendung von Jurkat-mRNA. Die menschliche T-Lymphomlinie Jurkat, die als positive Kontrolle für die Expression von RAP46-mRNA diente, scheint große Mengen verschiedener Transkripte von RAP46 zu transkribieren (Abb. 21A, Spur 4). Mit dem "Leervektor" (ohne cDNA) transfizierten Klon (Vektor) erhält man kein spezifisches Signal, ein leichter "Schmier" in der Spur erklärt sich durch den verwendeten 3'-Primer, der mit der Nukleotid-Sequenz von BAG-1 übereinstimmt und womöglich zur Synthese von unspezifischen PCR-Produkten führte. Die Qualität der für die RT-PCR verwendeten mRNA wurde durch die Amplifikation von GAPDH (Glyzeraldehydphosphat-Dehydrogenase) mit dafür spezifischen Primern überprüft (Abb. 21A, Spuren 5 bis 7).

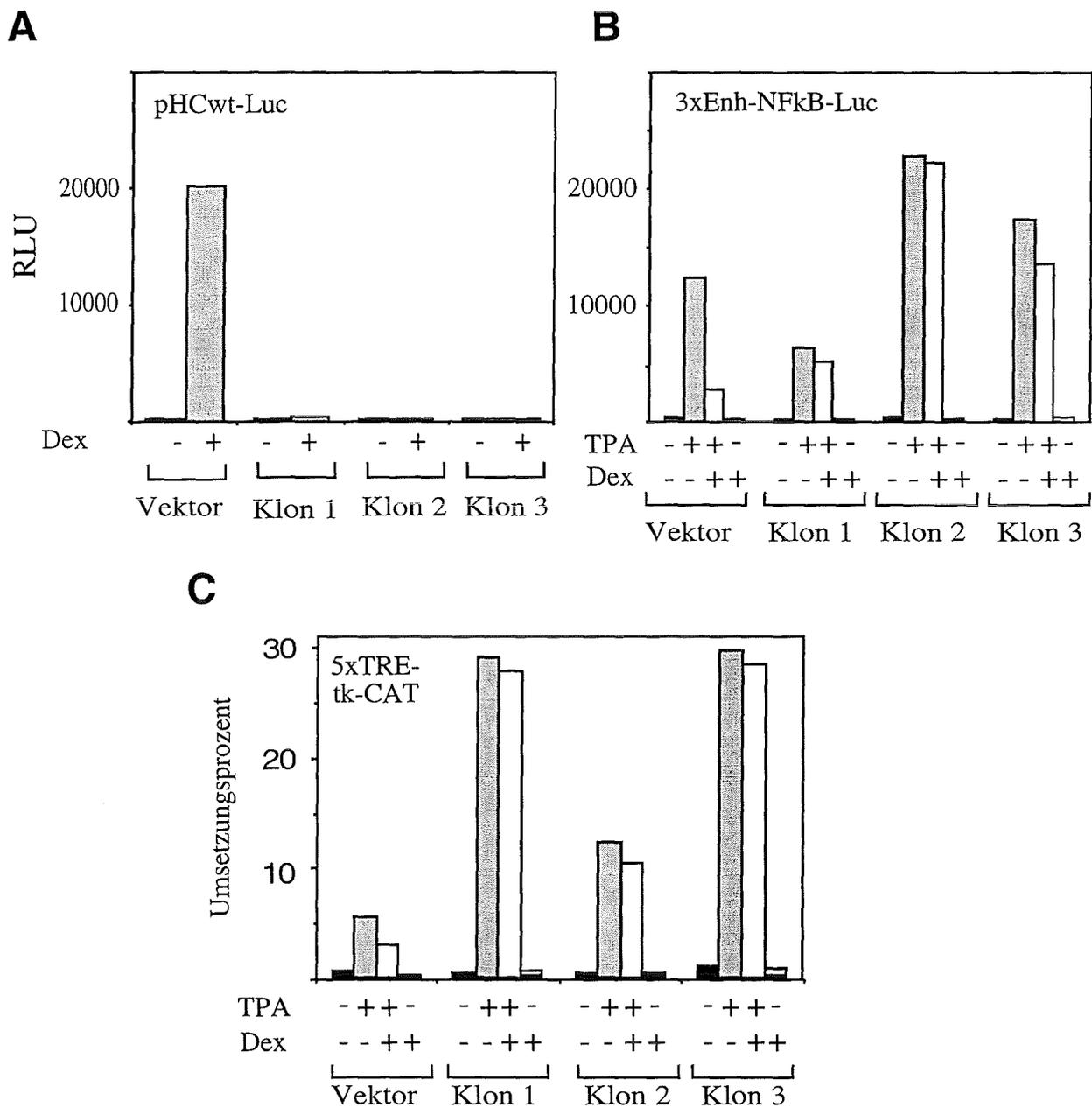
Eine schwache Expression von RAP46 in S49.1-Zellen ist demnach möglich und korreliert in ersten Experimenten mit einer Resistenz gegen Dexamethason. Vor einer genaueren Analyse des Einflusses der RAP46-Expression auf den Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock und Apoptose, wurde untersucht, wie sich die Expression von RAP46 auf die Transaktivierung und Transrepression durch den Glukokortikoidrezeptor auswirkt.

## **RAP46-Expression hemmt Transaktivierung und Transrepression durch den aktivierten Glukokortikoidrezeptor**

Es gibt bereits Hinweise darauf, daß die Interaktion von RAP46 mit dem Glukokortikoidrezeptor dessen transkriptionelle Funktionen beeinträchtigen kann. In transienten Transfektionsanalysen war durch RAP46-Expression die Aktivierung eines hormonabhängigen Reportergens durch Dexamethason (Dex) deutlich gehemmt (Kullmann et al., 1998). Um diese Experimente zu bestätigen und zusätzlich den Einfluß von RAP46-Expression auf die Transrepression des GR zu untersuchen, wurden Leervektor und drei verschiedene RAP46-exprimierende Klone mit Reportergenkonstrukten für GR-, AP-1- und NF- $\kappa$ B-Aktivität transfiziert und Transaktivierung und Transrepression durch den GR bestimmt.

Hormonbehandlung des mit dem Leervektor transfizierten Klons führt zu einer deutlichen Aktivierung des vom MMTV-(Maus-Mamma-Tumorvirus)-Promotor kontrollierten pHCwt-LUC-Reporters (Abb. 22A, Vektor), Repression der TPA-induzierten NF- $\kappa$ B-Reporter-Aktivität von 3xEnh-NF- $\kappa$ B-LUC (Abb. 22B, Vektor) und der Hemmung der AP-1-Aktivität von 5xTRE-tk-CAT (Abb. 22C, Vektor). Der mit dem Leervektor transfizierte Klon unterscheidet sich somit nicht von originären S49.1-Zellen (eigene nicht gezeigte Daten). Expression von RAP46 verhindert dagegen Transaktivierung von pHCwt-LUC (Abb. 22A, Klone 1, 2 und 3) und Transrepression der TPA-stimulierten NF- $\kappa$ B- und AP-1-Aktivität durch Dex (Abb. 22B, Klone 1, 2 und 3; Abb. 22C, Klone 1, 2 und 3). Die beeinträchtigten transkriptionellen Eigenschaften des GR sind nicht auf einen Verlust der GR-Expression zurückzuführen, denn in S49.1-Zellen, Leervektor-transfizierten und im exemplarischen Klon 1 werden durch Immunoblot-Analyse vergleichbare Mengen von GR detektiert (Abb. 22B).

Das Fazit der Transfektionsanalysen ist, daß RAP46-Expression die positive und negative Wirkung des aktivierten GR auf die Genexpression verhindert. Es stellt sich nun die Frage, ob ein transkriptionell inaktiver GR noch in der Lage ist, seine physiologischen Funktionen, Zellzyklusblock und Apoptose, in den RAP46-exprimierenden Klonen nach Dex-Behandlung noch auszuführen. Es wurden deshalb im weiteren Zellzyklus- und Apoptosebestimmungen mit den RAP46-exprimierenden Klonen durchgeführt.



**Abb. 22: RAP46-Expression in S49.1-Zellen hebt Transaktivierung und Transrepression durch den Glukokortikoidrezeptor auf.** Vektortransfizierte und RAP46-exprimierende S49.1-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten transfiziert und 6 h später mit 0,1  $\mu$ M Dex (A) oder (60 ng/ml) TPA in An- oder Abwesenheit von 0,1  $\mu$ M Dex (B und C) behandelt und nach weiteren 24 h für Luziferase- bzw. CAT-Assays geerntet. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die Analysen eingesetzt. Die Luziferaseassays sind in den vom Luminometer bestimmten Lichteinheiten (RLU) und die CAT-Assays als prozentualer Anteil von umgesetzten (mono- und diacetyliertem) zu nicht umgesetzten  $^{14}$ C-Chloramphenicol angegeben.

## **RAP46-Expression in S49.1-Zellen verhindert Apoptose und Zellzyklusblock durch Glukokortikoide**

Im ersten Teil der Arbeit wurde durch Glukokortikoidrezeptor-(GR)-Mutanten gezeigt, daß die genreprimierenden Eigenschaften wichtig für die Wachstumshemmung durch Glukokortikoide sind. Da RAP46 die genaktivierenden und genreprimierenden Funktionen des GR vollständig blockiert, ist anzunehmen, daß auch der Zellzyklusblock und die Apoptose in den RAP46-exprimierenden Klonen nicht mehr funktioniert.

Um dies zu überprüfen, wurden RAP46-exprimierende und Leervektor-transfizierte S49.1-Zellen unterschiedlich lange mit Dex behandelt und Apoptose durch verstärkte Bindung von Annexin V und DNA-Färbung mit Propidiumjodid mit anschließender Durchflußzytometrie bestimmt. Letztere Methode erlaubt auch die Bestimmung der Zellzyklusverteilung der behandelten Kulturen.

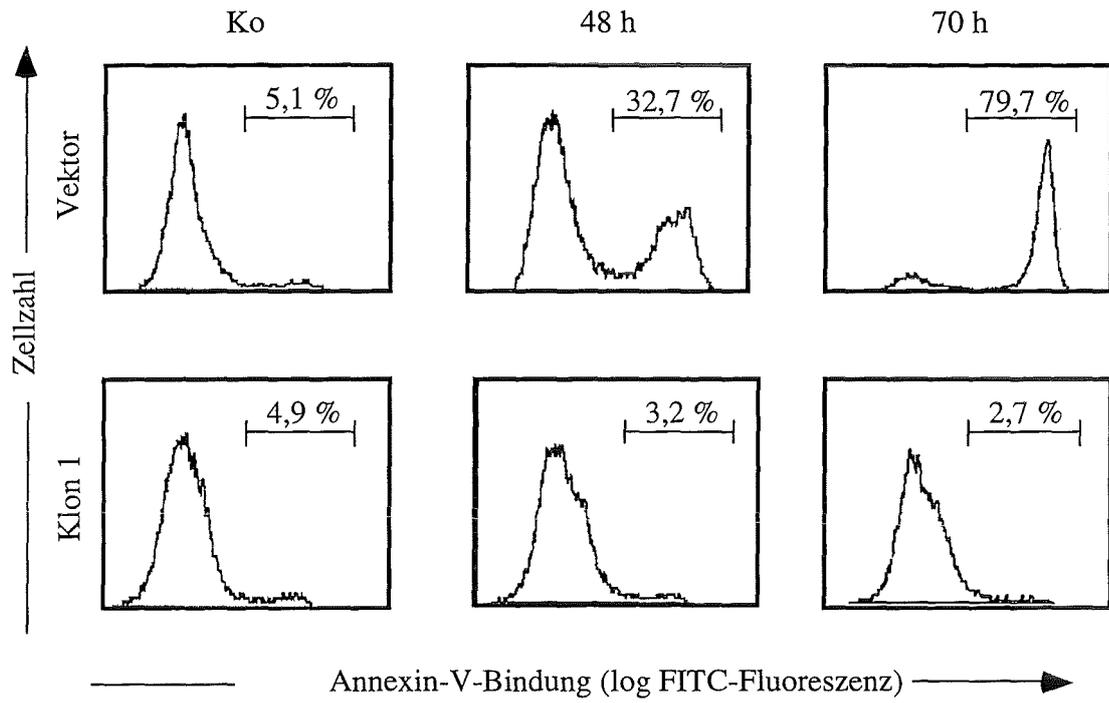
Die Experimente zeigten, daß RAP46-Expression den Dex-induzierten Zellzyklus-Block und die Apoptose verhindert. Bis zu 70 Stunden nach Dex-Behandlung war keine Apoptose als verstärkte Annexin V-Bindung in den RAP46-exprimierenden Klonen meßbar (Abb. 21A, Klon 1). Im Gegensatz dazu wurde aber eine deutliche Zunahme der Annexin V-Bindung in Leervektor-transfizierten S49.1-Zellen durch Dex induziert (Abb. 23A). Auch das "subG1"-Signal nimmt nur in Leervektor-transfizierten S49.1-Zellen zu (Abb. 23B, Vektor), nicht aber in den RAP46-exprimierenden Klonen (Abb. 23B). Die DNA-Färbung mit Propidiumjodid zeigt zudem, daß Dex-Behandlung der RAP46-exprimierenden Klone, nicht wie beim Leervektor-transfizierten Klon, zu einer deutlichen Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus führt, noch bevor Apoptose einzusetzen beginnt (Abb. 23B).

Die Expression von RAP46 in S49.1-Zellen, die Transaktivierung und Transrepression von Genen durch den aktivierten GR verhindert, hat demnach zur Folge, daß das Wachstum von S49.1-Zellen nicht mehr durch Glukokortikoide gehemmt wird. RAP46 ist daher ein negativer Regulator aller GR-Funktionen. Auf welcher Ebene die Regulation erfolgt, ob z.B. der Kerntransport oder die Stabilität des Rezeptors durch RAP46 beeinflußt werden ist noch nicht klar, aber zumindest der Verlust der DNA-Bindung des aktivierten GR an ein GRE (Glukokortikoid-reagierendes Element), konnte eindeutig gezeigt werden (Kullmann et al., 1998).

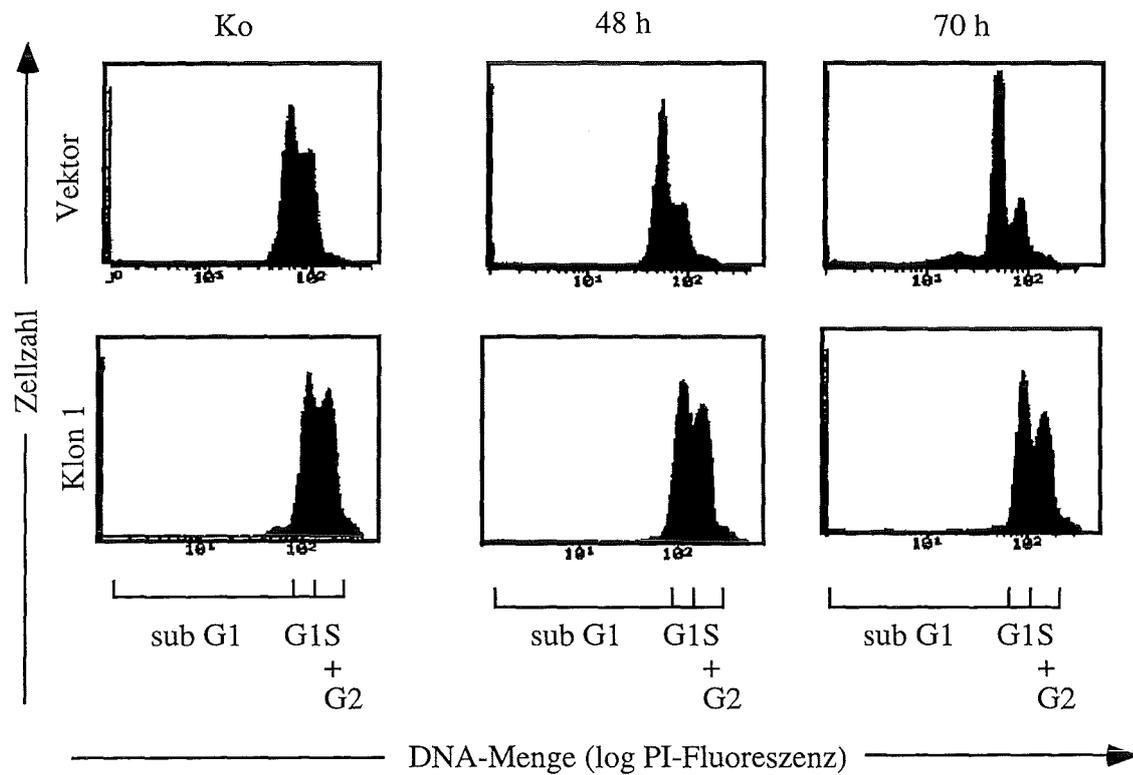
Wenn RAP46 ein negativer Regulator der GR-Funktion ist, dann sollte Verringerung der endogenen BAG-1-Menge den gegenteiligen Effekt haben und GR-Funktion verstärken. Es wurden daher Versuche unternommen, die BAG-1-Menge in S49.1-Zellen zu erniedrigen und die Auswirkungen auf Transaktivierung und Apoptose durch den aktivierten Rezeptor bestimmt.

Ergebnisse

A



B



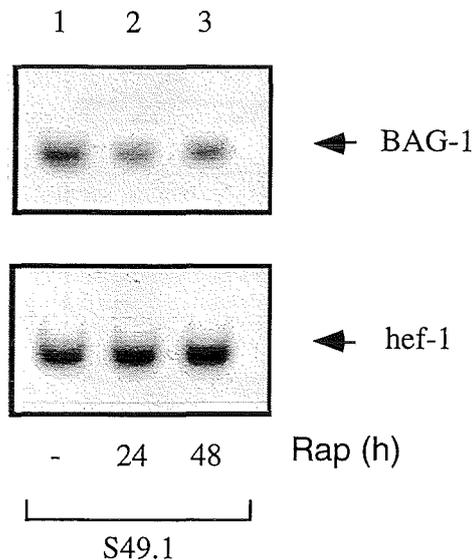
**Abb. 23 (vorherige Seite): RAP46-Expression in S49.1-Zellen schützt vor Apoptose und verhindert Zellzyklusblock durch Dexamethason.** **A.** Durchflußzytometrische Apoptosebestimmung durch die Annexin V-Methode von nicht oder unterschiedlich lange mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelten Leervektor- (Vektor) oder RAP46-exprimierenden S49.1-Zellen. Klon 1 ist exemplarisch für drei getestete RAP46-Klone. Der prozentuale Anteil von Annexin V-bindenden apoptotischen Zellen ist angegeben. Nekrotische Zellen wurden durch Propidiumjodid-Färbung von der Analyse ausgeschlossen. **B.** Die DNA-Menge pro Zelle der angegebenen Zelllinien wurde nach der Propidiumjodid-(PI)-Methode mit anschließender Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurden unterschiedlich lange mit 0,1  $\mu$ M Dex behandelte Zellen in 70 % Ethanol fixiert, mit NP40-NaCitrat-Puffer lysiert und die DNA mit 50  $\mu$ g/ml PI gefärbt. Unterhalb der Abbildungen sind die PI-Fluoreszenzintensitäten, die den DNA-Mengen der jeweiligen Zellzyklusphasen (G1, S+G2) oder apoptotischen ("sub G1") Zellkernen entsprechen, markiert.

## Rapamycin verringert die Expression von BAG-1 und RAP46

Um eine weitere Bestätigung der inversen Korrelation von RAP46-Expression und Glukokortikoidrezeptor-(GR) Funktion zu erhalten, wurde versucht, die endogene Menge an BAG-1 zu erniedrigen.

Kürzlich wurde veröffentlicht, daß die BAG-Expression einer hämapoietischen Zelllinie, nach Entfernen ihres essentiellen Wachstumsfaktors, durch IL-2 (Interleukin 2) stimuliert werden kann und die Induktion in Anwesenheit von Rapamycin verringert wird (Adachi et al., 1996).

Deshalb wurden S49.1-Zellen unterschiedlich lange mit Rapamycin behandelt und die mRNA-Menge von RAP46 und BAG-1 durch Northern-Blot-Analyse bestimmt.



**Abb. 24: Rapamycin verringert die Menge von BAG-1 und RAP46.** Northern-Blot-Analyse mit je 5  $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup>-mRNA von nicht oder unterschiedlich lange mit 1  $\mu$ M Rapamycin behandelten S49.1-Zellen. Standardisierung der mRNA-Mengen erfolgte durch Rehybridisierung mit einer cDNA-Probe des menschlichen Elongationsfaktors 1 (hef-1)

In Anwesenheit von Rapamycin war 24 und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn die Expression von BAG-1 in S49.1-Zellen um 40 % verringert (Abb. 24, oberer Teil), während die Expression des zur Normierung verwendeten menschlichen Elongationsfaktor 1 (hef-1) unverändert blieb (Abb. 24, unterer Teil). Damit konnte Rapamycin als negativer Regulator der BAG-Expression in S49.1-Zellen bestätigt werden.

Da eine negative Regulation von Rapamycin auf die Expression von BAG-1 in S49.1-Zellen vorliegt, wurde im weiteren der Einfluß von Rapamycin auf die Funktion des GR untersucht.

## **Rapamycin verstärkt Transaktivierung und Apoptose durch Glukokortikoide**

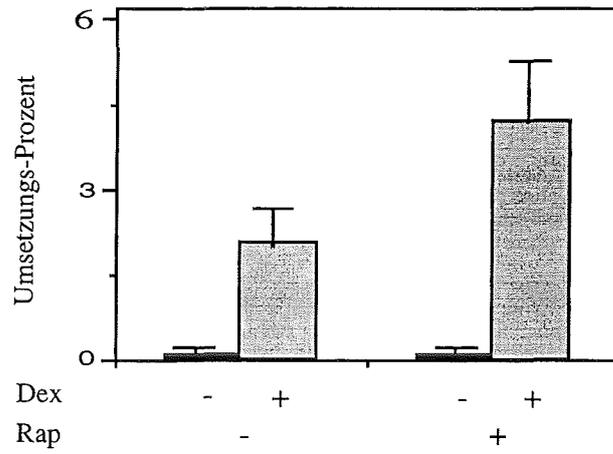
Der Effekt von Rapamycin auf Transaktivierung durch den Glukokortikoidrezeptors (GR) wurde in Reporteranalysen und der Einfluß auf Glukokortikoid-induzierte Apoptose als Annexin V-Bindung durch Durchflußzytometrie bestimmt. Für ersteres wurden S49.1-Zellen mit dem Reporter pHcwt-CAT (Cato et al., 1988), der das Chloramphenicolacetyltransferasegen unter der Kontrolle des MMTV-(Maus-Mamma-Tumorvirus)-Promotors exprimiert, transfiziert und die Aktivierung des Reporters durch Dexamethason (Dex) in Ab- und Anwesenheit von Rapamycin bestimmt.

Es stellte sich heraus, daß in Gegenwart von Rapamycin, Dex-Behandlung bereits spätestens nach 24 Stunden Apoptose als verstärkte Annexin V-Bindung induziert, zu einem Zeitpunkt, an dem Dex alleine noch keine Apoptose in S49.1-Zellen auslöste (Abb. 25B). Obwohl Rapamycin-Behandlung alleine, selbst nach 48 Stunden, keine Apoptose in S49.1-Zellen induzierte, verstärkte es die nach 48 Stunden Dex-behandlung ausgelöste Apoptose um das etwa 1,8-fache. Dies korrelierte mit einer Verstärkung des Dex-Effekts bei der Aktivierung von pHcwt-CAT um das 1,5 fache (Abb.25A). Der Effekt auf die Transaktivierung des GR korreliert demnach gut mit der Verstärkung der Dex-induzierten Apoptose (Abb. 25B). Die Verstärkung der Transaktivierung durch den GR in Gegenwart von Rapamycin ist ein bekanntes Phänomen, und erst kürzlich wurde auch die Verstärkung von

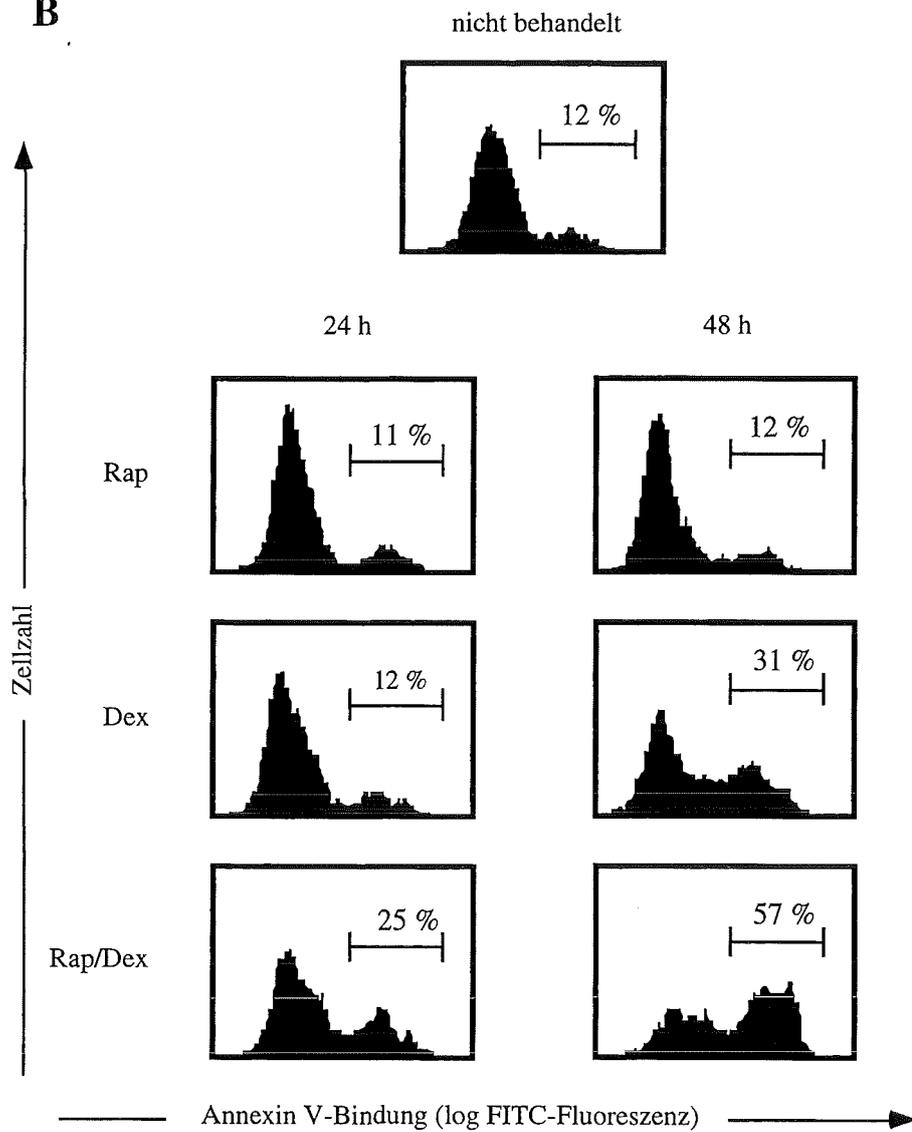
**Abb. 25 (nächste Seite): Rapamycin verstärkt Transaktivierung und Apoptose durch den Glukokortikoidrezeptor.** A. Transiente Transfektion von S49.1-Zellen mit pHcwt-CAT nach der DEAE-Dextran-Methode. 6 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 0,1 µM Dex und/oder 1 µM Rapamycin behandelt und 24 h später für CAT-Assays geerntet. Graphisch ist die relative CAT-Aktivität als Verhältnis von umgesetzten (mono- und diacetyliertem <sup>14</sup>C-Chloramphenicol) zu nicht umgesetztem in Prozent angegeben. Statistische Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen. B. Apoptosebestimmung von S49.1-Zellen, die nicht oder mit 0,1 µM Dex und/oder 1 µM Rapamycin für die angegebenen Zeiten behandelt wurden, nach der Annexin V-Methode. Prozentualer Anteil von apoptotischen Zellen ist angegeben.

Ergebnisse

A



B



Glukokortikoid-induzierter Apoptose berichtet (Ning und Sanchez, 1993; Shi et al., 1995; Ishizuka et al., 1997).

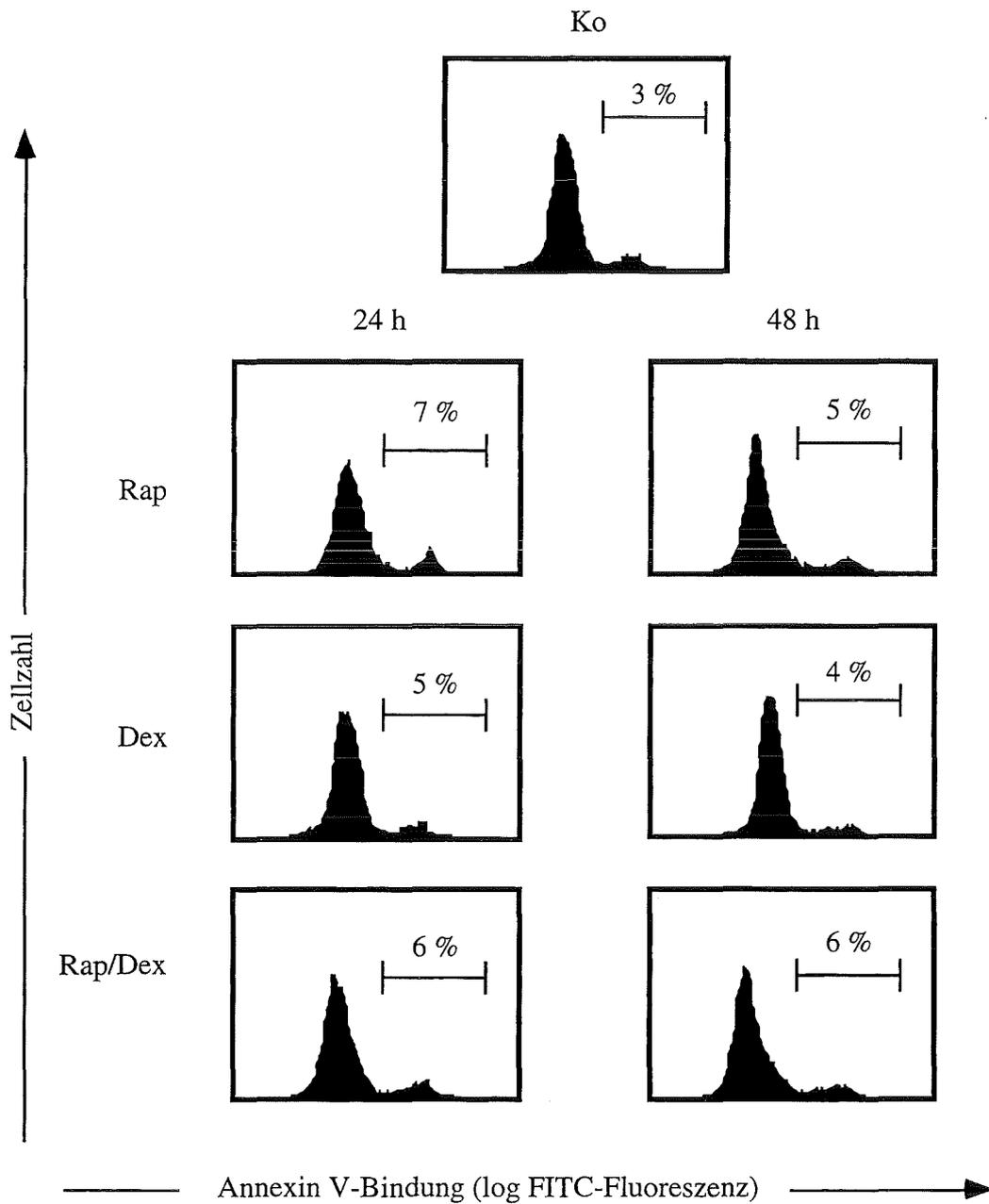
Die negative Regulation von RAP46/BAG-1 bei gleichzeitiger Steigerung der GR-Funktion durch Rapamycin und die negative Regulation der GR-Funktion durch Expression von RAP46 in S49.1-Zellen sind gute Indizien dafür, daß RAP46 ein negativer Regulator der GR-Funktion ist. Dies würde bedeuten, daß bei konstitutiver Expression von RAP46, Rapamycin keinen Einfluß auf Dex-induzierte Apoptose hätte. Es wurde daher als nächstes untersucht, ob RAP46-Expression in S49.1-Zellen, die negative Regulation von BAG-1 durch Rapamycin ausgleichen kann.

### **RAP46-exprimierende Klone sind auch bei gleichzeitiger Rapamycinbehandlung resistent gegen Glukokortikoide**

Die BAG-1-Expression in S49.1-Zellen wird durch Rapamycin negativ reguliert und korreliert invers mit der Glukokortikoidrezeptor-(GR)-Aktivität. Um zu bestätigen, daß die Reduktion der BAG-1-Menge direkt für die Steigerung der glukokortikoidinduzierten Apoptose verantwortlich ist, wurden Apoptosebestimmungen in RAP46-exprimierenden Klonen durchgeführt, mit der Erwartung, daß die konstitutive Expression von RAP46, Apoptose durch Dexamethason (Dex) auch in Gegenwart von Rapamycin verhindert. Dazu wurden RAP46-exprimierende S49.1-Zellen verschieden lange mit Dex in An- und Abwesenheit von Rapamycin kultiviert und Apoptose durch Annexin V-Bindung durchflußzytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, daß Dex-Behandlung, auch in Gegenwart von Rapamycin, zu keiner verstärkten Annexin V-Bindung der Klone (exemplarisch Klon 1) führt (Abb. 26). Dieses Experiment bestätigt demnach die negative Regulation der GR-Funktion durch RAP46, das durch Expression in S49.1-Zellen vollständig die Verringerung der BAG-1-Expression funktionell kompensiert.

Die Analysen des zweiten Teils dieser Arbeit etablierten demnach RAP46 als einen negativen Regulator der GR-Funktionen.

## Ergebnisse



**Abb. 26:** Apoptose von RAP46-exprimierenden S49.1-Zellen wird auch in Anwesenheit von Rapamycin nicht durch Dexamethason induziert. RAP46-exprimierende S49.1-Zellen (exemplarisch Klon 1) wurden unterschiedlich lange mit 0,1  $\mu$ M Dex und/oder 1  $\mu$ M Rapamycin behandelt und anschließend Apoptose-Messungen nach der Annexin V-Methode durchgeführt. Der relative Anteil apoptotischer Zellen ist in Prozent angegeben.

## **Diskussion**

Glukokortikoide sind wegen ihrer biologischen Wirksamkeit weit verbreitete therapeutische Substanzen bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten. Besonders der Einfluß auf Zellen des Immunsystems hat die Glukokortikoidhormone als Bestandteil von entzündungshemmenden und immunsupprimierenden Medikamenten etabliert.

Für seine genaktivierenden und genreprimierenden Funktionen benötigt der Glukokortikoidrezeptor (GR) offensichtlich noch die Wechselwirkung mit zusätzlichen Faktoren. Die funktionelle Analyse solcher Koaktivatoren bzw. könnte neue Möglichkeiten zur Entwicklung von therapeutischen Substanzen, die Glukokortikoid-Wirkungen in gewünschter Weise modulieren, eröffnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mechanismen, die zur Wachstumshemmung einer Thymomzelllinie durch Glukokortikoide führen, genauer untersucht. Zunächst wurde der Einfluß von Hormonbehandlung auf die Expression von Zellzyklusproteinen analysiert. Durch die Verwendung von dissoziierenden Glukokortikoidrezeptoren wurde der Beitrag der genaktivierenden und genreprimierenden Eigenschaften des GR zum Zellzyklusblock und der Apoptose bestimmt. Im letzten Teil der Arbeit wurde eine funktionelle Analyse des mit dem Glukokortikoidrezeptor interagierenden Proteins RAP46 durchgeführt, mit der Fragestellung, ob die Interaktion eine physiologische Konsequenz hat, d.h. ob RAP46 mit den transkriptionellen Eigenschaften des GR und dem Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock oder der Apoptose interferiert.

### **Teil 1: Beitrag von Transaktivierung und Transrepression bei dem Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock und der Apoptose von T-Zellen**

Zellen des Immunsystems, insbesondere T-Zellen, reagieren auf Glukokortikoide mit einer Wachstumshemmung, die durch Verzögerung der Proliferation und/oder Induktion von Apoptose verursacht wird. Die molekulare Basis der Glukokortikoid-Wirkungen ist die Modulation der Genexpression, wobei die Expression von Genen durch Glukokortikoide positiv oder negativ beeinflusst werden kann. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, welcher Einfluß auf die Genexpression für die nützlichen und welcher für die unerwünschten Effekte bei Glukokortikoid-Therapien verantwortlich ist. Da inzwischen allgemein angenommen wird, daß der Induktion und Repression von Genen durch Glukokortikoide verschiedene molekulare Mechanismen zu Grunde liegen, besteht die Hoffnung, Substanzen zu entwickeln, die selektiv aktivieren oder reprimieren können. Mit solchen "dissoziierenden Liganden" des Glukokortikoidrezeptors kann versucht werden, selektiv die verschiedenen physiologischen

Funktionen des Glukokortikoidrezeptors zu induzieren und damit nachteilige Nebenwirkungen zu minimieren oder zu vermeiden.

## **Die Rolle von p27<sup>Kip1</sup> bei der Proliferationshemmung durch Glukokortikoide**

Der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus setzt die sequentielle Phosphorylierung von Substraten wie das Retinoblastomgenprodukt Rb oder Histon durch zyklinabhängige Kinasen (cdks) voraus. Die Zellzyklusprogression wird durch Substanzen verhindert, die die Aktivität von cdks negativ beeinflussen (Zellzyklusblock). Dies kann z.B. durch negative Regulation der Menge von Zyklinen (cycs), den katalytischen Untereinheiten der cdks und der cdks selbst geschehen. Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von cdks zu hemmen, wird durch inhibitorische Proteine, den cdk-Inhibitoren (cdkIs) ermöglicht. Die Induktion solcher cdk-Inhibitoren führt zur Zerstörung oder Inaktivierung von cyc/cdk-Komplexen und somit zu einem effektiven Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus.

Der cdk-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> akkumuliert nach verschiedenen antimitogenen Stimuli wie cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) oder TGF $\beta$  und hemmt die Aktivität der cdk4 und cdk2 (Kato et al., 1994; Polyak et al., 1994). Besonders in T-Zellen besteht eine inverse Korrelation von Aktivierung/Wachstum und der Menge von p27<sup>Kip1</sup> (Kwon et al., 1996; Kwon et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Glukokortikoid-induzierte Wachstumshemmung der Thymomzelllinie S49.1 durch eine Induktion von p27<sup>Kip1</sup> erfolgen könnte.

## **Regulation von Zellzyklusproteinen durch Glukokortikoide in S49.1-Zellen**

Die Behandlung von S49.1-Zellen mit Dexamethason (Dex) führte zu einer deutlichen Wachstumshemmung durch Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Dieser G1-Block korrelierte mit einer Zunahme der aktiven hypophosphorylierten Form des Retinoblastomproteins (Rb). Die Veränderung im Phosphorylierungsstatus von Rb ließ einen negativen Einfluß von Glukokortikoiden auf die Aktivität von cdks vermuten. Ursächlich für die Aktivierung von Rb und den Zellzyklusblock in S49.1-Zellen könnte die Hemmung der Expression von Zyklinen (cycs) und zyklinabhängigen Kinasen (cdks) sein. Dex-Behandlung führte zu einer starken Verringerung der Mengen von cyc D3 und cdk4 und zu einer weniger deutlichen Erniedrigung der Menge von cdk2, während die cyc E-Menge auch nach längerer Hormonbehandlung annähernd konstant blieb.

Die negative Regulation von cyc D3 ist eine bekannte Glukokortikoid-Wirkung auf T-Zellen (Reisman und Thompson, 1995). Die negative Regulation von cyc D3 kann aber nicht allein für den Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock verantwortlich sein. Dies weiß man aus Experimenten, bei denen cyc D3 in einer T-Zelllinie überexprimiert wurde. Dabei fand man

heraus, daß die Überexpression zwar die negative Regulation von *cyc D3* und der *cdk4*-Aktivität kompensiert, aber dennoch Glukokortikoide das Wachstum effizient hemmten (Rhee et al., 1995). Es mußte demnach noch andere Mechanismen geben, durch die Glukokortikoide den Zellzyklus von T-Zellen blockieren.

Zusätzlich zur negativen Regulation von Zyklinen und *cdks*, führt die positive Regulation von *cdk*-Inhibitoren zu einem Block im Zellzyklus. *p27<sup>Kip1</sup>* ist ein wichtiger *cdk*-Inhibitor, der durch diverse antimitogene Stimuli in T-Zellen positiv reguliert wird. Es wurde daher der Einfluß von Hormonbehandlung auf die Expression von *p27<sup>Kip1</sup>* untersucht.

Es stellte sich heraus, daß Dex-Behandlung von S49.1-Zellen, zu einer deutlichen Akkumulation von *p27<sup>Kip1</sup>*-Protein führt und die *cdk2*-Aktivität nach spätestens 24 Stunden Behandlung vollständig gehemmt ist. Die *cdk2*-Hemmung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Induktion von *p27<sup>Kip1</sup>*-Protein zurückzuführen, da sich nach Dex-Behandlung verstärkt *p27<sup>Kip1</sup>* im *cyc E/cdk2*-Komplex befand. Damit konnte in T-Zellen zum ersten Mal die Proliferationshemmung durch Glukokortikoide mit der Induktion von *p27<sup>Kip1</sup>* und der Hemmung der *cdk2*-Aktivität in Verbindung gebracht werden. Bis vor kurzem war weder die Induktion von *p27<sup>Kip1</sup>*, noch die Hemmung der *cdk2*-Aktivität durch Glukokortikoide bekannt. Erst in letzter Zeit wurde, auch in S49.1-Zellen, eine Induktion von *p27<sup>Kip1</sup>* berichtet, aber kein Effekt auf *cdk*-Aktivitäten oder Zellzyklusverteilung gezeigt (Rogatsky et al., 1997). Die Autoren behaupteten, daß Glukokortikoide nur in Abwesenheit von Rb-Expression die Expression von *p21* bzw. *p27<sup>Kip1</sup>* induzieren. Dies wurde in Glukokortikoidrezeptor (GR) überexprimierenden Osteosarkomzelllinien gezeigt, die entweder endogenes Rb exprimierten oder Rb-defizient waren (Rogatsky et al., 1997). Die Abwesenheit von Rb-Expression ist aber keine generelle Voraussetzung für die positive Regulation der *p27<sup>Kip1</sup>*-Expression, da die in dieser Arbeit verwendeten S49.1-Zellen Rb exprimieren. Eine Zellspezifität bezüglich dem Einfluß von Glukokortikoiden auf Zellzyklus-regulierende Proteine kann demnach nicht von der Rb-Expression abhängig sein.

Dennoch deuten neuere Veröffentlichungen immer mehr auf zellspezifische Wirkungen von Glukokortikoiden hin. So wurde gezeigt, daß Glukokortikoid-Behandlung einer Hepatom- und einer Fibroblastenzelllinie zu einem Zellzyklusblock in G1 führt (Ramos et al., 1996; Ramalingam et al., 1997). Dies korrelierte mit der Induktion des *cdk*-Inhibitors *p21* und der Hemmung der *cdk4*- bzw. *cdk2*-Aktivität (Cha et al., 1998; Ramalingam et al., 1997). Keinen Effekt hatte Hormonbehandlung auf die Zyklin- und *cdk*-Mengen und auf den *cdk*-Inhibitor *p27<sup>Kip1</sup>*.

In dieser Arbeit wurde eindeutig nachgewiesen, daß der Glukokortikoid-induzierte Zellzyklusblock der Thymomlinie S49.1, mit der Induktion der *p27<sup>Kip1</sup>*-Proteinmenge korreliert. Auch wenn der Einfluß auf die Expression anderer *cdk*-Inhibitoren, wie z.B. *p21*, nicht eindeutig geklärt ist, kann man davon ausgehen, daß die *p27<sup>Kip1</sup>*-Akkumulation am Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock beteiligt ist.

Weitere Analysen müssen die zelltypspezifische Induktion von p27<sup>Kip1</sup>-Protein bestätigen. Ein geeignetes Zellsystem ist das von peripheren T-Zellen *in vitro*. Diese befinden sich im nicht aktivierten Zustand in der G0-Phase des Zellzyklus. Durch Antigen- bzw. CD3-Stimulation treten die T-Lymphozyten in die G1-Phase ein und durch Kultur in IL-2-(Interleukin 2)-haltigem Medium wird die Proliferation für eine begrenzte Zeitdauer aufrecht erhalten. Das Fortschreiten im Zellzyklus korreliert in diesem System mit einer schnellen Verringerung der Menge von p27<sup>Kip1</sup>-Protein und -mRNA (Kwon et al., 1996). Parallel dazu werden die zyklinabhängigen Kinasen cdk4 und cdk2 aktiviert (Kwon et al., 1997). In diesem Zellsystem wäre es interessant zu untersuchen, ob die Glukokortikoid-Behandlung von G0-Lymphozyten die negative Regulation von p27<sup>Kip1</sup> verhindert oder in proliferierenden T-Lymphozyten p27<sup>Kip1</sup>-Protein induziert. In einem ähnlichen Zellsystem war durch Dexamethason-Behandlung möglich, die Proliferation von bestimmten T-Zellklonen zu hemmen (Tuosto et al., 1994). Solche Zellsysteme sollten sich auch dazu eignen, die Notwendigkeit der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion für den Zellzyklusblock durch Glukokortikoide zu beweisen, da inzwischen Mauslinien existieren, die kein funktionelles Allel für p27<sup>Kip1</sup> mehr besitzen (p27<sup>Kip1</sup> "knock out"). Wenn die Induktion von p27<sup>Kip1</sup>-Protein kausal für die Proliferationshemmung durch Glukokortikoide ist, dann sollten p27<sup>Kip1</sup> -/- T-Zellen durch Hormonbehandlung nicht oder deutlich weniger stark gehemmt werden. Solche Experimente werden in naher Zukunft an unserem Institut durchgeführt.

### **Zwei Mechanismen der Induktion von p27<sup>Kip1</sup>: Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein und Aktivierung der Transkription**

Da die positive Regulation von p27<sup>Kip1</sup> noch nicht bekannt war, wurde der mögliche Mechanismus untersucht, wie Glukokortikoide die Expression von p27<sup>Kip1</sup> induzieren.

Diverse antimitogene Stimuli sind als Induktoren der p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge beschrieben. So sind z.B. cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und TGF $\beta$  (Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ) wirksame Inhibitoren der T-Zellproliferation und Induktoren der p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge. Dabei waren posttranslationelle Mechanismen an der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion beteiligt (Kato et al., 1994; Polyak et al., 1994).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, daß tatsächlich posttranslationelle, aber zusätzlich noch transkriptionelle Mechanismen zur Akkumulation von p27<sup>Kip1</sup>-Protein beitragen.

## **Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein durch Glukokortikoide**

Die Vorbehandlung von S49.1-Zellen mit Dexamethason verlängerte die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup>-Protein auf mehr als drei Stunden. Im Gegensatz dazu lag die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup>-Protein in unbehandelten Zellen bei einer bis zwei Stunden. Dies deutet auf einen posttranslationalen Mechanismus hin, der die Degradation von p27<sup>Kip1</sup>-Protein verzögert oder verhindert. Tatsächlich ist für p27<sup>Kip1</sup> eine Regulation der Proteinmenge durch das proteolytische Ubiquitinsystem bekannt (Pagano et al., 1995). So konnte ein, in serumgehungerten Zellen verzögerter, spezifischer Abbau von p27<sup>Kip1</sup>-Protein durch Komponenten des Ubiquitinsystems gezeigt werden. Aus diesen Experimenten wurde postuliert, daß die Verlängerung der Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup>-Protein durch Inhibition des Ubiquitin-Degradationssystems geschieht (Pagano et al., 1995).

Die Degradation durch das Ubiquitinsystem wird oft durch die Phosphorylierung des abzubauenen Proteins eingeleitet. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel hierfür ist der stimulierte Abbau des Inhibitorproteins von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B. Dabei führt eine durch mitogene Signale induzierte Signalkaskade zu einer Phosphorylierung von Serinen im I $\kappa$ B-Molekül. Diese Phosphorylierung macht I $\kappa$ B für das Ubiquitinsystem zugänglich, welches zum Abbau von I $\kappa$ B, der Freisetzung und anschließenden transkriptionellen Aktivität von NF- $\kappa$ B führt (Wulczyn et al., 1996). Die Markierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein für das Ubiquitinsystem könnte ebenfalls durch Phosphorylierung geschehen. So ist verschiedenen, neueren Publikationen zu entnehmen, daß p27<sup>Kip1</sup> an einer Threoninposition durch cdk2 phosphoryliert und dadurch destabilisiert werden kann, im Gegensatz zu einer Mutante mit einem Aminosäureaustausch an dieser Position (Vlach et al., 1997; Sheaff et al., 1997).

Von einigen Substanzen weiß man, daß sie die Menge von p27<sup>Kip1</sup> ohne einen Einfluß auf die Transkription induzieren. So steigert die Behandlung von T-Zellen mit cAMP, Wortmannin oder Rapamycin die Menge an p27<sup>Kip1</sup>-Protein, nicht aber die von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA (Kato et al., 1994; Brennan et al., 1997; Nourse et al., 1994). Allen drei Substanzen ist die Hemmung des PI3-Kinase-Signalwegs gemeinsam, wobei die molekularen Wirkmechanismen der Hemmung nur für Wortmannin und Rapamycin bekannt sind.

Auch Dexamethason-Behandlung von S49.1-Zellen interferierte mit dem PI3-Kinase-Signalweg. Es konnte eine deutliche Repression der Phosphorylierung der p70/p85 S6Kinase, einer Komponente des PI3-Kinase-Signalwegs unterhalb der PI3-Kinase, beobachtet werden. Die Hemmung des PI3-Kinase-Signalwegs durch Glukokortikoide ist nicht auf S49.1 beschränkt, sondern konnte auch in einer anderen T-Zelllinie gezeigt werden (Monfar & Blenis, 1996). Die genauere Analyse des Mechanismus ergab, daß Glukokortikoide unterhalb der PI3-Kinase, aber nicht direkt die p70 s6Kinase mit dem PI3-Kinase-Signalweg interferieren. Der negative Einfluß von Glukokortikoiden wird dabei sehr wahrscheinlich von einem durch Hormon induzierten Faktor vermittelt, da die Hemmung der p70 S6Kinase nur in Anwesenheit von Transkription erfolgt (Monfar & Blenis, 1996). Auf

welcher Stufe des PI3-Kinase-Signalwegs wirkt dieser hypothetische, hormoninduzierte Faktor ? Eine Antwort darauf könnte die Bestimmung des Einflusses von Dexamethason auf andere Komponenten des PI3-Kinase-Signalwegs geben. Zwei solcher Moleküle, die als wichtige Komponenten der Wachstumskontrolle von T-Zellen angesehen werden, sind die durch Lipide aktivierbaren Kinasen PKB (Proteinkinase B) und mTOR ("mamalian target of rapamycin"; Brennan et al., 1997; Thomas und Hall, 1997). Wenn die Inhibition des PI3-Kinase-Signalwegs durch Glukokortikoide durch Interferenz mit der Aktivität einer dieser beiden Moleküle vermittelt wird, dann sollte durch Überexpression von konstitutiv aktiver PKB oder mTOR der stabilisierende Effekt von Glukokortikoiden auf p27<sup>Kip1</sup>-Protein aufgehoben werden. Da zudem die Aktivierung von PKB durch eine Phosphorylierung der Kinase erfolgt, könnte man durch Verwendung von in der Zwischenzeit verfügbaren phosphospezifischen Antikörpern, den Einfluß von Hormon auf die Aktivität der PKB bestimmen. Tatsächlich konnte in ersten Experimenten die Phosphorylierung von PKB in S49.1-Zellen durch Dexamethason-Behandlung verringert werden. Diese vorläufigen Beobachtungen bedürfen aber noch weiterer Bestätigung. Auch wenn eine Beteiligung der PKB an der Stabilisierung/Destabilisierung von Zellzyklusfaktoren bisher nicht direkt gezeigt werden konnte, ist ihr Beitrag zur Proliferation von T-Zellen unbestritten (Brennan et al., 1997).

### **Aktivierung der p27<sup>Kip1</sup>-Transkription durch Glukokortikoide**

Überraschenderweise konnte in dieser Arbeit, zusätzlich zur Stabilisierung von p27<sup>Kip1</sup>-Protein, noch die Aktivierung der Transkription von p27<sup>Kip1</sup> gezeigt werden.

Die Behandlung von S49.1-Zellen mit Dexamethason führte bereits nach vier Stunden zu einer signifikanten Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA-Menge, die nach spätestens 24 Stunden maximal war und bis mindestens 48 Stunden nach Behandlung anhielt. Eine Erhöhung von p27<sup>Kip1</sup>-mRNA wurde bisher noch nicht beschrieben, lediglich eine negative Regulation durch CD3-Aktivierung von T-Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden (Kwon et al., 1996). Nur das Dioxin TCDD (2, 3, 7, 8-Tetrachloro-di-benzo-P-Dioxin) verstärkt ebenso die Transkription von p27<sup>Kip1</sup>. (Kumar Kolluri, IGEN, persönliche Mitteilung).

Die genauere Analyse des Mechanismus der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA-Induktion zeigte, daß Dex-Behandlung zu einer Aktivierung des p27<sup>Kip1</sup>-Promotors führt und daher von einem transkriptionellen Mechanismus auszugehen ist. Durch Verwendung von verschiedenen langen Promotor-Reporterkonstrukten konnte ein minimaler Bereich von etwa 600 bp vor dem Transkriptionsstart bestimmt werden, der ausreicht, um durch Hormon aktiviert zu werden. Innerhalb dieses Promotorbereichs wurde eine potentielle Bindestelle für den Glukokortikoidrezeptor von der Position -462 bis -448 identifiziert. Die 3' gelegenen 6 Basen mit der Sequenz TGTCCT entsprechen der stark konservierten rechten Hälfte der Konsensussequenz eines Glukokortikoid-reagierenden Elements (GRE). Außerdem war ein 200 bp-Fragment, welches das potentielle GRE enthielt, in der Lage, Aktivierbarkeit eines heterologen Promotors durch Hormon zu vermitteln. Um einen Hinweis zu bekommen, ob die

potentielle GR-Bindestelle funktionell ist, wurden zwei Basen so verändert, daß keine Bindung des Rezeptor mehr möglich sein sollte. Es stellte sich heraus, daß die beiden Mutationen, im Kontext des -615-p27-Reporterkonstrukts, die Induzierbarkeit um etwa 40 % verringerten. Interessanterweise konnte diese Oligosequenz, im Gegensatz zur Wildtypsequenz, nicht mehr mit einem Konsensus-GRE in Gelretardationsanalysen um die Bindung des Glukokortikoidrezeptors kompetieren (Jean Schneikert, IGEN). Beide Experimente machen eine direkte Bindung des aktivierten Glukokortikoidrezeptors an das potentielle GRE wahrscheinlich. Dennoch konnte in vorläufigen Experimenten keine Bindung des Rezeptors an das p27-GRE gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, daß die Bindung nicht sehr stark ist und/oder vielleicht zusätzliche Faktoren für die DNA-Bindung des Glukokortikoidrezeptors notwendig sind. Dafür spricht auch die in dieser Arbeit gefundene Cykloheximid-Sensitivität der p27<sup>Kip1</sup>-mRNA-Induktion. Die Bindung eines solchen zelltypspezifischen Faktors sollte innerhalb der 200 bp-Sequenz erfolgen, die Glukokortikoid-Induzierbarkeit vermittelte. Innerhalb dieser 200 bp-Sequenz befindet sich neben der potentiellen Bindestelle für den GR noch eine vermutliche "CCAAT-Box". Es ist daher gut möglich, daß die Transkriptionsfaktoren, die an diese "CCAAT-Box" binden, für die Basalaktivität des GRE-tk-LUC verantwortlich sind. Auf welche Weise der GR auf diese Sequenz Einfluß nimmt, kann im Moment nur Spekulation sein. Entweder der GR bindet an das potentielle GRE, dann müßte er die zuvor gebundenen Faktoren zumindest teilweise verdrängen oder der GR aktiviert die Expression von Transkriptionfaktoren, die dann verstärkt an die CCAAT-Box binden und die Transkription von p27<sup>Kip1</sup> induzieren.

Drei der am ehesten dafür in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren sind Mitglieder der C/EBP, NF-Y- und CTF/NF-1-Familien. Dabei handelt es sich um strukturell voneinander sehr unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, denen lediglich die Bindung an CCAAT-Boxen von Promotoren gemeinsam ist.

Die C/EBP-Familienmitglieder (u.a. C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$ ) sind dadurch gekennzeichnet, daß sie untereinander Homo- und Heterodimere ausbilden können und daß die unterschiedlichen Formen für die gewebespezifische Expression bestimmter Gene verantwortlich sind. So wurde interessanterweise in Hepatomzellen, die durch Glukokortikoide im Wachstum gehemmt werden, eine Induktion von p21, nicht aber von p27<sup>Kip1</sup> beobachtet, wobei die Aktivierung der p21-Transkription zum Großteil durch Induktion von C/EBP $\alpha$  vermittelt wurde (Ramos et al., 1996; Cha et al., 1998; Cram et al., 1998).

Ob, und welche C/EBP-Mitglieder in S49.1-Zellen eine Rolle bei der positiven Regulation der p27<sup>Kip1</sup>-Expression spielen, müssen zukünftige Untersuchungen erweisen.

Im Moment kann aber noch nichts über die Identität des an die CCAAT-Box bindenden Faktors gesagt werden.

## **Rolle von Transaktivierung und Transrepression beim Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock**

Es besteht ein großes Interesse an pharmakologisch wirksameren Glukokortikoiden. Um dies zu erreichen, müssen die Mechanismen der Glukokortikoidrezeptor-(GR)-Wirkungen genauer verstanden werden. In dieser Arbeit wurde der Beitrag der Transaktivierungs- und Transrepressions-Funktionen des GR zum Zellzyklusblock und zur Apoptose untersucht.

Dazu wurden GR-negative S49.1G3.R1 durch virusproduzierende  $\Omega$ E-Zellen mit den für Wildtyp-GR und LS7-Mutante codierenden RNAs stabil infiziert und auf Expression der integrierten cDNAs getestet. Es wurde ein Wildtyp-GR und drei LS7-Mutante exprimierende Klone erhalten. Durch Reporteranalysen wurde gezeigt, daß die stabile Expression die erwarteten transkriptionellen Eigenschaften der Rezeptoren in den S49.1G3.R1 rekonstituiert. Der Wildtyp-GR-exprimierende Klon aktivierte nach Hormonbehandlung effizient ein durch den MMTV-Promotor reguliertes Reportergen und hemmte deutlich die induzierte Aktivität eines AP-1-abhängigen Reporters. Im Gegensatz dazu aktivierten die LS7-Mutante exprimierenden Klone den MMTV-Promotor kaum, hemmten aber immer noch effektiv die induzierte AP-1-Reporteraktivität. Da sie sich demnach wie "dissoziierende Rezeptoren" verhielten, waren die LS7-Klone für weitere funktionelle Analysen geeignet. Das Interesse bestand darin, herauszufinden, ob die genreprimierenden Eigenschaften des GR ausreichen, um den Zellzyklus zu blockieren.

Zur Überraschung führte weder die Dex-Behandlung des Wildtyp-GR- noch die eines LS7-Klons zu einem signifikanten Zellzyklusblock. Dies bedeutet, daß die Rekonstitution von genaktivierenden und genreprimierenden GR-Funktionen nicht genügt, den Glukokortikoid-induzierten Zellzyklusblock in S49.1G3.R1 wiederherzustellen.

Die Analyse, der in S49.1-Zellen durch Dex regulierten Zellzyklusfaktoren ergab, daß in den stabilen Zelllinien weder eine negative Regulation von Zyklin D3 (cyc D3), noch eine positive Regulation von p27<sup>Kip1</sup> durch Dex erfolgt. Dieses ist somit sehr wahrscheinlich die Ursache für die Resistenz gegen Glukokortikoid-Behandlung der Klone. Warum cyc D3 und p27<sup>Kip1</sup> nicht durch Glukokortikoide reguliert werden, darüber kann im Moment nur spekuliert werden. Die Tatsache, daß beide Zellzyklusfaktoren betroffen sind, deutet auf die Beeinträchtigung der GR-Signalleitung eines gemeinsamen Mechanismus hin. Die Transaktivierungs- und Transrepressionseigenschaften des Wildtyp-GR und der LS7-Mutanten schließen einen Defekt der hormoninduzierten Transformation des GR aus. Denkbar ist aber, daß ein durch Glukokortikoide induzierter Faktor für die negative bzw. positive Regulation von cyc D3 bzw. p27<sup>Kip1</sup> notwendig ist, der in den stabilen Klonen nicht durch Dex induziert werden kann. Dafür sprechen Experimente zum Mechanismus der negativen Regulation der cyc D3-mRNA, deren Stabilität anscheinend durch einen Glukokortikoid-induzierten Faktor verringert wird (Reisman & Thompson, 1995). Der Defekt in den stabil exprimierenden Klonen wird wohl erst dann klar, wenn der Mechanismus der

p27<sup>Kip1</sup>-Promotoraktivierung aufgeklärt ist (siehe oben).

Durch diesen experimentellen Ansatz konnte zwar nicht geklärt werden, welcher der beiden transkriptionellen Eigenschaften des GR den Zellzyklusblock von T-Zellen vermittelt, doch die Voraussetzung von Transkription bei der negativen Regulation von cyc D3 und die Cykloheximidsensitivität der positiven Regulation von p27<sup>Kip1</sup>, sind gute Argumente, um zum gegenwärtigen Zeitpunkt von Genaktivierung durch den GR auszugehen.

## **Unabhängigkeit von Glukokortikoid-induziertem Zellzyklusblock und Apoptose**

Die Glukokortikoid-induzierte Apoptose in S49.1-Zellen hatte alle morphologischen und biochemischen Charakteristika des programmierten Zelltods: Fragmentierung des Zellkerns, Induktion einer DNA-Leiter durch Endonukleaseaktivität, Veränderung der Lipidexposition in der Plasmamembran, die proteolytische Spaltung von PARP (Polyadenosinribosyl-Polymerase) und die Verhinderung der Apoptose in Gegenwart von Caspaseinhibitoren.

Die stabile Expression des Glukokortikoidrezeptors (GR) in Zellen, die zuvor die Expression des GR verloren hatten, rekonstituierte die hormoninduzierte Apoptose. Dies bestätigt noch einmal, daß die Glukokortikoid-induzierte Apoptose ein GR-abhängiger Prozess ist.

Die Rekonstitution des apoptotischen Programs hatte etwas überrascht, da der Zellzyklusblock durch die stabile Expression des GR in S49.1G3.R1 nicht wiederhergestellt wurde. Dies bedeutet, daß der Zellzyklusblock an sich, keine notwendige Voraussetzung für die Glukokortikoid-induzierte Apoptose ist; die Apoptose scheint vielmehr unabhängig von der Regulation von Zellzyklusfaktoren durch Hormon induzierbar zu sein. Dies haben Experimente in den stabil exprimierenden S49.1G3.R1 bestätigt, wo trotz Expression des transkriptionell aktiven GR, kein Einfluß auf die Expression der Zellzyklusfaktoren Zyklin D3 (cyc D3) und p27<sup>Kip1</sup> durch Dexamethason erfolgte. Da außerdem Rapamycin-Behandlung von S49.1-Zellen zur Induktion der p27<sup>Kip1</sup>-Menge und eines G1-Zellzyklusblocks führte, aber auch nach längerer Behandlung keine Apoptose in S49.1-Zellen auslöste, ist es unwahrscheinlich, daß die Glukokortikoid-induzierte Apoptose in S49.1-Zellen durch die negative Regulation von cyc D3 oder p27<sup>Kip1</sup> erfolgt. Dennoch wird auch eine Induktion von Apoptose in Zellen durch Überexpression von p27<sup>Kip1</sup> berichtet. Die Autoren beschreiben die Adenovirus-vermittelte Überexpression von p27<sup>Kip1</sup> in einer Reihe von Tumorzelllinien, die zur Apoptose der infizierten Zellen führt (Katayose et al., 1997; Wang et al., 1997). Doch scheint die ektopische Überexpression nicht die physiologische Funktion von p27<sup>Kip1</sup> widerzuspiegeln, da neuere Publikationen, im Gegenteil, die Inaktivierung von p21 und p27<sup>Kip1</sup> und resultierende Aktivierung der cdk2 mit der Einleitung von Apoptose in Verbindung bringen (Levkau et al., 1998). Dies deutet auf antiapoptotische Funktionen der beiden cdk2-Inhibitoren hin. Denkbar wäre, daß die antiapoptotische Funktion von p21 und p27<sup>Kip1</sup> durch Inaktivierung der cdk2 in einer Phase des Zellzyklus erfolgt (wahrscheinlich G1-Phase), wo cdk2-Aktivität Apoptose

induzieren würde. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu erfahren, ob die cdk2 mit Beginn der Apoptose in S49.1-Zellen wieder aktiviert wird.

Zumindest für die Glukokortikoid-induzierte Apoptose von Thymozyten ist p27<sup>Kip1</sup> nicht notwendig. Dies haben Experimente gezeigt, wo Thymozyten aus Mäusen, die kein funktionelles Allel für p27<sup>Kip1</sup> exprimierten ("p27<sup>Kip1</sup>-knock out"), durch Glukokortikoid-Behandlung immer noch in die Apoptose gingen (Kiyokawa et al., 1996).

Da die hormoninduzierte Apoptose von Thymozyten aber nur in Gegenwart von Proteinbiosynthese erfolgt (Wyllie, 1980), muß es Gene geben, die durch Glukokortikoide positiv reguliert werden und die Induktion der Apoptose vermitteln.

## **Rolle von Transaktivierung und Transrepression bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose von T-Lymphomen**

Die Glukokortikoid-induzierte Apoptose ist eine Funktion des Glukokortikoidrezeptors (GR) und die Folge veränderter Genexpression Thymozyten, die kein funktionelles Allel für den GR exprimieren ("GR-knock-out") sind resistent gegenüber Hormonbehandlung (Cole et al., 1995).

Aus therapeutischen Gründen besteht ein großes Interesse daran zu wissen, welcher Einfluß auf die Genexpression für die lympholytische Wirkung von Glukokortikoiden verantwortlich ist. Dabei geht es darum, ob Glukokortikoide durch Induktion der Expression von proapoptotischen Genen ("Lysisgene") oder durch Repression von antiapoptotischen Genen ("Überlebensgene") Apoptose verursachen.

Die stabile Infektion von Wildtyp-GR und LS7-Mutante in S49.1G3.R1-Zellen führte zur Expression von transkriptionell aktiven Rezeptoren. Die Analyse der stabil exprimierenden Klone ergab, daß die LS7-Mutante exprimierenden Klone nur sehr schwach ein MMTV-kontrolliertes Reporter-gen aktivierten, aber induzierte AP-1-Reporter-genaktivität effizient hemmten. Dies bestätigte frühere Experimente mit der gleichen GR-Mutante in anderen Zellsystemen (Helmberg et al, 1995; Heck et al., 1997). Die Dex-Behandlung der LS7-Klone führte in zwei von drei LS7-exprimierenden Klonen zu Apoptosis, was gegen einen genaktivierenden Mechanismus bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose spricht. Die Hemmung von AP-1-Aktivität scheint aber nicht ausreichend zu sein, da nicht alle LS7-exprimierenden Klone durch Dex in die Apoptose gehen. Der Einfluß von Hormonbehandlung auf NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität war in den stabil transfizierten Zelllinien nicht möglich. Daher wurde die Glukokortikoid-Wirkung auf die Expression von c-myc untersucht und eine Korrelation von negativer Regulation und Induktion von Apoptose in den LS7-exprimierenden Klonen gefunden. Da die Transkription von c-myc zumindest zum Teil unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B-Aktivität steht, könnte die bekannte negative Interferenz des aktivierten GR mit der NF- $\kappa$ B-Aktivität, gut mit der Auslösung von Apoptose in T-Zellen korrelieren.

Dies entspricht einer gängigen Vorstellung, nach der NF- $\kappa$ B als positiver Transkriptionsfaktor für antiapoptotische Gene wirkt (Wu et al., 1996A). Dabei könnte c-myc eines von vielen durch

NF- $\kappa$ B-Faktoren reguliertes antiapoptotisches "Überlebensgenen" sein (Wu et al., 1996) und folglich Hemmung dieser NF- $\kappa$ B-Überlebensaktivität die Apoptose einleiten und proapoptotische Signale wirksam werden lassen (Beg & Baltimore; Wu et al., 1996; Wang et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996; Liu et al., 1996). Dafür spricht auch, daß die Überexpression von c-myc in einer T-Lymphomzelllinie teilweise vor hormoninduzierter Apoptose schützt (Thulasi et al., 1993).

Die Untersuchungen zum Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Apoptose von T-Lymphomen führten teilweise zu kontroversen Ergebnissen bezüglich der Wichtigkeit von genaktivierenden Eigenschaften des GR. Diese Experimente wurden mit aminoterminalen Deletionsmutanten des GR durchgeführt, die keine positive Genregulation mehr vermitteln konnten (Dieken und Miesfeld, 1992; Chapman et al., 1996). Leider wurden die Transrepressions-Funktionen dieser Mutanten nicht untersucht, sodaß die Frage offen blieb, wie wichtig diese Funktion für die Apoptose ist.

In anderen Untersuchungen, mit der DNA-Bindungsdefekten Mutante LS7 in Jurkat- (Helmberg et al., 1995) und S49.1-Zellen (diese Arbeit) wurde aber eindeutig gezeigt, daß die negative Regulation der Genexpression durch den GR ausreicht, für die Induktion von Apoptose.

## Glukokortikoid-induzierte Apoptose von Thymozyten

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Thymomen (diese Arbeit) und T-Lymphomen (Helmberg et al., 1995), welche die Wichtigkeit der genreprimierenden Eigenschaften des Glukokortikoidrezeptors (GR) bei der Apoptose belegten, stehen zwei Publikationen, die sich mit den Mechanismen der hormoninduzierten Apoptose von Thymozyten befaßten. Beide Publikationen argumentieren für einen genaktivierenden Mechanismus bei der Glukokortikoid-induzierten Apoptose. Bereits vor längerer Zeit konnte gezeigt werden, daß die Apoptose von Thymozyten durch Glukokortikoide nur in Gegenwart von Proteinbiosynthese geschieht, woraus man folgerte, daß ein hormoninduziertes Protein die Apoptose auslöst (Wyllie, 1980). Eine neuere Veröffentlichung berichtet über den Austausch des Wildtyp-GR mit einer Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdefekten Mutante durch homologe Rekombinationstechniken in Mäusen ("knock in, Dim-Maus") und dessen Auswirkungen auf verschiedene physiologische Funktionen des GR. Dabei wurde unter anderem gezeigt, daß diese Mäuse Thymi haben, deren Thymozyten resistent gegen Glukokortikoide sind (Reichardt et al., 1998). Da eine genauere Analyse bestätigte, daß diese GR-Mutante in verschiedenen, aus der Maus isolierten Zelltypen (z.B. primäre Fibroblasten), kaum noch Transaktivierungs-, aber volle Transrepressionsfunktion besaß, unterstützte dies die Hypothese, daß die Aktivierung der Genexpression durch den GR Apoptose einleitet.

Es scheinen daher unterschiedliche Mechanismen in Thymozyten und T-Lymphomen vorzuliegen, durch die Glukokortikoide Apoptose induzieren. Zudem besteht der Thymus aus Thymozyten von unterschiedlichen Reifungsstadien, die sich durch die Expression bestimmter Oberflächen-Rezeptoren voneinander unterscheiden. Um einen Vergleich mit den *in vitro*-Systemen etablierter Zelllinien machen zu können, sollten Thymozyten-Subpopulation getrennt untersucht werden, um sie mit den etablierten Zelllinien vergleichen zu können.

Es wäre daher sehr wichtig zu erfahren, wie andere lymphoide Zellen, z.B. periphere T-Zellen oder induzierte Lymphome, der "Dim-Maus" auf Glukokortikoide reagieren. Denkbar wäre, daß Glukokortikoide in proliferierenden oder transformierten T-Zellen andere Mechanismen der Lyse benützen, als in primären, nicht proliferierenden Thymozyten.

## **Teil 2: BAG-1/RAP46 als negative Regulatoren der Glukokortikoidrezeptor-Funktion**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß RAP46 ein negativer Regulator der Glukokortikoidrezeptor-(GR)-Funktionen ist. So verhinderte die stabile Expression von RAP46 in S49.1-Zellen vollständig Transaktivierung und Transrepression durch den GR. Dies bedeutet, daß der GR unter dem Einfluß der RAP46-Expression nicht mehr transkriptionell aktiv ist.

In den RAP46-exprimierenden Klonen waren auch die physiologischen Funktionen des GR inaktiviert. Dies bestätigte die Erwartung, daß der GR ohne seine transkriptionellen Funktionen keinen Zellzyklusblock und keine Apoptose mehr auslösen kann.

Die inverse Korrelation von RAP46-Expression und GR-Funktion wurde durch Experimente bestätigt, in denen die endogene BAG-1-Expression in S49.1-Zellen durch Rapamycin-Behandlung verringert wurde. Dies verstärkte die Apoptose durch den GR. Dieser Einfluß von Rapamycin wurde durch RAP46-Expression in S49.1-Zellen vollständig kompensiert.

Die ursprüngliche Hoffnung, daß die Experimente zur Aufklärung des Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Apoptose beitragen, wurde nicht erfüllt. Da die RAP46-Expression alle transkriptionellen Funktionen des GR inhibierte, konnten keine neuen Erkenntnisse zur Rolle von Transaktivierung und Transrepression bei der hormoninduzierten Apoptose gewonnen werden.

Die Experimente zeigten aber, daß RAP46-Expression zu einer vollständigen Insensitivität von Zellen führt, die normalerweise durch Glukokortikoide in die Apoptose gehen.

Die Tatsache, daß die Expression eines Proteins die nützlichen, therapeutischen Wirkungen von Glukokortikoiden vollständig eliminiert, könnte die Ursache von sog. Resistenzphänomenen bei Glukokortikoid-Therapien sein.

### **Mögliche physiologische Rolle von BAG-1/RAP46**

Zukünftige Experimente müssen zeigen, welche physiologischen Funktionen BAG-1/RAP46 haben. Dabei muß geklärt werden, ob die negative Regulation auf den Glukokortikoidrezeptor (GR) beschränkt ist und welche physiologischen Konsequenzen diese Funktion von RAP46 hat.

Verminderte GR-Funktionen sind häufig die Ursache von ineffizienten Glukokortikoid-Therapien (Lamberts, 1996). Die Analyse der molekularen Ursachen ließ zwei unterschiedliche Formen solcher Glukokortikoid-Resistenzen erkennen: Einmal "erbliche" Formen, die durch Mutationen im Glukokortikoidrezeptorgen erklärt werden können (Lamberts, 1996; DeRijk und Sternberg, 1997; Leung et al., 1998) und wesentlich häufiger "erworbene" Resistenzen, die sich scheinbar erst bei längerfristigen Therapien ausbilden (Lamberts, 1996; DeRijk und Sternberg, 1997; Leung et al., 1998). Es besteht daher ein erhebliches Interesse daran, die molekularen Ursachen von Glukokortikoid-Insensitivitäten zu verstehen, um, wenn eine solche Resistenz erkannt wird, andere Therapieansätze zu verfolgen. Falls GR-interagierende Proteine

## *Diskussion*

wie RAP46 zu solchen Insensitivitäten beitragen, wäre die negative Regulation der Expression solcher Moleküle, eine Möglichkeit bessere therapeutische Wirkungen zu erreichen. Angenommen RAP46 wäre an der Entwicklung einer Glukokortikoid-Resistenz beteiligt, dann könnte das Immunsuppressiva Rapamycin, in Kombination mit Glukokortikoiden, durch die negative Regulation von RAP46 die Resistenz überwinden helfen. Zumindest führte die gleichzeitige Behandlung mit Rapamycin und Dexamethason zu einer Steigerung der Apoptose von S49.1-Zellen.

Die Bestimmung der RAP46-Expression in Immunzellen von Patienten mit einer Glukokortikoid-Insensitivität sollte einen möglichen Zusammenhang von RAP46 und der Ausbildung von Glukokortikoid-Resistenzen zu erkennen geben.

## Material

### Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetyl-Coenzym A	Sigma, München
Acridinorange	Sigma, München
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose (SeaKem LE)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumazetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
DEPC, Diethyl Pyrocarbonat	Fluka, Buchs Schweiz
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Buchs Schweiz
EDTA	Merck, Darmstadt
Eichproteine, vorgefärbt	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylazetat	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteus-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker, Verviers
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzylglyzin	Merck, Darmstadt

## Material und Methoden

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Miobill-Plastikwolle	Migros, Basel
MOPS	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-tertramethylenethylendiamin	BioRad, München
N,N'-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorit	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Boehringer, Mannheim
Nukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
PMSF, Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma, Deisenhofen
Phenol	USB, Cleveland USA
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Serva, Heidelberg
RNase A	Sigma, Deisenhofen
SDS, Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München
tRNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Difco, Detroit
Tween20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

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

### **Induktoren und Inhibitoren**

Puromycin (Pm), 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA), Dexamethason und A23187 wurden von Sigma, Deisenhofen erhalten. ZK091588 (ZK A), ZK57740 (ZK B), ZK077945 (ZK C), ZK079642 (ZK D) und RU486 wurden von Schering, Berlin zur Verfügung gestellt.

### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Fuji Bio-Imaging Analyzer BAS1.000	raytest, Straubenhardt
Brutschrank	Labotect, Göttingen
Crocodile II Thermocycler	Appligene
DC-Platten (Kieselgel-beschichtet)	Macherey-Nagel, Düren
DEAE-Membran NA 45	Schleicher & Schuell
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Wheaton Scientific, Millville, USA
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
FACStar <sup>PLUS</sup>	Beckton Dickinson, Heidelberg
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Hyperfilm XR <sup>®</sup>	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hybond N <sup>+</sup>	Amersham-Buchler, Braunschweig
Kontron-Hermle Centrifon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1	Beckmann, Stuttgart
Luminometer, Lumat LB 9501	Berthold
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Plastikzentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran (Immobilon)	Millipore, Bedford
Oligo (dT)-Cellulose Type 7	Pharmacia, Freiburg
Quiagen-tip 500-Säulen	Diagen GmbH, Hilden
Sephadex G-25 und G-50	Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Kühlzentrifuge	Heraeus, Stuttgart
Titertek Multiscan PLUS MKII Elisa-Reader	Labsystems, Finnland
Transferapparat für Western Blot	BioRad, München
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg

Vakuum-Konzentrator ("speed vac")	Savant, Farmingdale
3MM Whatman Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen

### **Enzyme**

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

### **Radiochemikalien**

$[[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP: 370 Mbq/ml, 10 mCi/ml}$

D-Threo-[dichlorazetat-1- $^{14}\text{C}$ ]-Chloramphenicol 7,4 MBq/ml, 200  $\mu\text{Ci/ml}$

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

### **Antikörper**

anti Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	Boehringer, Mannheim
anti p70s6Kinase (C-18)	Santa Cruz, Heidelberg
anti Rb (C-15)	Santa Cruz Heidelberg
anti cyclin D3 (18B6-10)	Santa Cruz, Heidelberg
anti p27 <sup>Kip1</sup> (Clone DCS-72.F6)	Dunn, Asbach
anti p27 <sup>Kip1</sup> (M-197)	Santa Cruz, Heidelberg
anti Bag-1 (C-16)	Santa Cruz, Heidelberg
anti Bag-1 (N-20)	Santa Cruz, Heidelberg
anti GR, monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch gegen Maus- und Ratten-Glukokortikoid-Rezeptor gerichtet, zur Verfügung gestellt von U. Gehring, Heidelberg.	
anti Kanninchen HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
polyklonal, IgGs aus Ziege, Peroxidase-gekoppelt, gerichtet gegen alle Kanninchen IgG Subklassen	
anti Maus HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
polyklonal, IgGs aus Kanninchen, Peroxidase-gekoppelt, gerichtet gegen alle Maus IgG Subklassen	

### Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl

SOB-Medium: 2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>

SOC-Medium: SOB + 20 mM Glukose

Bakterienplatten wurden durch Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter Medium hergestellt und mit den entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin) versehen.

### Lösungen und Puffer

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>;

6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6

20 x SSC: 3 M NaCl; 0,25 M Na-Zitrat pH 6,5

TBE: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA

TE: 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

### Bakterienstämme

E. coli DH5 $\alpha$ ; Genotyp: F-,  $\Delta$ 80 $\Delta$ lacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *supE44*, *relA1*, *deoR*,

### Zelllinien

**Jurkat:** Menschliche lymphoide CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> T-Zelle (Wesselborg et al., 1993). Die Kabelitz Zellen wurden von Dr. B. Schraven (Universität Heidelberg) erhalten.

**S49.1:** Maus Thymom-Zelllinie (Gehring et al., 1982)

**S49.1.G3.R1:** Abgeleitet von S49.1, kein funktioneller Glukokortikoid-Rezeptor (Gehring et al., 1982)

**$\Omega$ E:** Maus-Fibroblasten-Zelllinie zur retroviralen Infektion von murinen Zellen.

**$\Omega$ E-GR:** stabil mit pBrGR transfizierte  $\Omega$ E-Zellen.

**$\Omega$ E-LS-7:** Stabil mit pBrGRLS-7 transfizierte  $\Omega$ E-Zellen.

**S<sup>-</sup>-GR:** durch  $\Omega$ E-GR infizierte, Ratten-Glukokortikoid-Rezeptor exprimierende S49.1.G3.R1-Zellen.

**S<sup>-</sup>-LS7:** durch  $\Omega$ E-LS-7 infizierte, Ratten-Glukokortikoid-Rezeptor-LS-7-Mutante exprimierende S49.1.G3.R1-Zellen.

**S<sup>+</sup>-RAP:** stabil mit pBRAP46 transfizierte S49.1-Zellen.

**S<sup>+</sup>-PURO:** stabil mit pBABE Puro transfizierte S49.1-Zellen.

## Oligonukleotide

**gapdh-primer:** 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 5'-TCCACCACCC  
TGTTGCTGTA-3

**rap46  $\delta$ 41-primer:** 5'-CCGGATCCCAGGGCGAAGAGATGA-3'

**rap46 273-primer:** 5'-AAGAATTCGGCCAGGGCAAAGTTT-3'

## Oligonukleotid zur Mutagenisierung

**mutiertes p27-Oligo:** 5'-CGCGACCAGCCAATATCATGGCGGCGCTACGGGG-3

## Plasmid-DNAs

### cDNA-Vektoren für die Herstellung von Northern-Proben

**pGAPDH-13** enthält ein 1,3 kp Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Fort et al.*, 1985) der Ratte. Für die Markierung wurde das Fragment nach PstI-Verdau isoliert.

**c-myc** enthält Exon 3 des menschlichen c-myc-Gens, 1,8 kb-Fragment isolierbar durch ClaI/EcoRI-Restriktionsverdau (Oncor Probes/Dianova, Hamburg).

**CMV<sub>5</sub>- $\alpha$ p27** enthält die ersten 500 bp von Ratten-p27-cDNA in Antisense-Orientierung, Isolierung durch EcoRI/XbaI-Verdau. Von Kumar Kolluri, IGEN zur Verfügung gestellt.

**pBRAP46** enthält rap46-cDNA, 1,3 kb-cDNA-Fragment durch EcoRI-Verdau isolierbar.

**pXcD3** enthält menschliche cDNA für cyclin D<sub>3</sub>, 530 bp-PstI-Fragment wurde verwendet.

### Reportergen-Konstrukte

**5xTRE-tk-CAT** besteht aus der 5-fachen, alternativ orientierten "TRE"—Sequenz des menschlichen Kollagenase-Gens vor dem Thymidinkinase-Promotor fusioniert mit dem bakteriellen CAT-Gen (*Jonat et al.*, 1990).

**-517+63-Coll-Luc** besteht aus dem Bereich -517 bis +63 des menschlichen Kollagenase I-Promotors kloniert in die Luziferase-Kassette des Plasmids pXP<sub>2</sub> (*Schneikert et al.*, 1996).

**pHcwt-CAT** besteht aus dem HaeIII-Fragment des MMTV-LTR von -631 bis +125 fusioniert vor das bakterielle CAT-Gen (*Cato et al.*, 1988).

**pHcwt-Luc** besteht aus dem HindIII/BglII-Fragment des MMTV-LTR kloniert in die Luziferase-Kassette vom Plasmid pXP<sub>2</sub> (*Heck et al.*, 1997).

**6xNf $\kappa$ B-tk-Luc (= 3xEnh-tk-Luc)** enthält 6 Bindestellen für Nf $\kappa$ B des HIV-Promotors (*Israel et al.*, 1992).

**p27PG-1609, p27GL-1382, p27GL-988, p27GL-615 und p27GL-42** bestehen aus verschieden große Maus-p27<sup>Kip1</sup>-Promotorsequenzen im pGLBASIC-Vektor (*Kwon et al.*, 1996), freundlicher Weise von Dr. Albert Nordin zur Verfügung gestellt.

**pT81 (Nordeen, 1988)** Luzifersereporter-Plasmid mit minimalem tk-Promotor; von C. Weiß zur Verfügung gestellt.

**Expressionsvektoren:**

**pBABE-Puro:** Retroviraler Vektor des OmegaE-Infektionssystems (Morgenstein und Land, 1990).

**pBrGR:** Ratten-Glukokortikoid-Rezeptor cDNA im pBABE-PURO-Vektor erhalten durch Ligation des geblunteten XbaI-Fragments aus pRc/CMV-GR (Helmberg et al., 1994) in EcoRI-geschnittenen, geblunteten pBABE-PURO-Vektor.

**pBrGR-LS-7** Ratten-Glukokortikoid-Rezeptormutante LS-7 cDNA im pBABE-PURO-Vektor erhalten durch Ligation des geblunteten XbaI-Fragments aus pRc/CMV-LS-7 (Helmberg et al., 1994) in EcoRI-geschnittenen, geblunteten pBABE-PURO-Vektor.

**pBRAP46** rap46-cDNA in pBABE-PURO-Vektor, zur Verfügung gestellt von Jean Schneikert, IGEN.

## **Methoden**

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus Maniatis et al. (1982) und *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) abgeleitet.

### **Arbeiten mit Nukleinsäuren**

#### **Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren**

Proteinhaltige Nukleinsäurelösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer Phenol (mit 1 x TNE gesättigte Lösung; 1 x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0)/Chloroformlösung (Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)) versetzt und kräftig gemischt. Nach einer anschließenden Phasentrennung durch 5-minütige Zentrifugation bei 13000 g wurde die obere wäßrige Phase gesammelt und mit einem weiteren Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durch erneutes kräftiges Mischen von Phenol und Proteinresten gereinigt.

#### **Nukleinsäure-Fällung**

DNA in wäßriger Lösung wurde mit 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 4,6) auf eine Endmolarität von 0,3 eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C oder für kürzere Dauer bei -80°C. Das Präzipitat wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 13000 g gesammelt und mitausgefallenes Salz durch Behandlung mit 70 % Ethanol aus dem DNA-Präzipitat entfernt. Die nach erneuter Zentrifugation pelletierte DNA wurde an der Luft oder im Vakuum ("speed vac") getrocknet und im gewünschten Volumen Wasser oder Puffer gelöst.

#### **Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

DNA- oder RNA-Konzentrationen wäßriger Lösungen wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA und 20 µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotide. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0 liegen.

### **Präparation größerer Plasmid-DNA-Mengen durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie ("Maxi-Präp")**

Selektionsmedium (LB, mit 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit dem gewünschten Bakterienklon beimpft und bei 37°C über Nacht in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden durch 10 min Zentrifugation bei 3600 g gesammelt, das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml RNase A) aufgenommen und die Bakterien durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) lysiert. Nach etwa 5 min Inkubation bei RT wurde das Bakterienlysate mit 10 ml Puffer P3 (3 M Kaliumazetat pH 5,5) versetzt, für etwa 20 min auf Eis gestellt und bei 4°C mit 7000 g 20 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip 500-Säulen nach den Anweisungen des Herstellers. Nach Bindung der Plasmid-DNA an das mit 10 ml 750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Ethanol equilibrierte Säulenmaterial wurden Verunreinigungen mit 40 ml 1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Ethanol ausgewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml 1,25 M NaCl; 50 mM MOPS pH 8,5; 15 % Ethanol von der Säule eluiert, mit dem 0,8-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert (30 min mit 14000 g bei 4°C), mit 80%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft oder im Vakuum ("speed vac") getrocknet und schließlich im gewünschten Volumen Wasser oder Puffer gelöst.

### **Präparation kleinerer Plasmid-DNA-Mengen ("Mini-Präp")**

Die gewünschte Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsröhrchen überführt und 10 s bei 13000 g zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 100 µl Lysozymbilösung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0) resuspendiert, kurz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung (0,2 M NaOH; 1 % SDS) wurde kurz geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 150 µl 3 M Natriumazetatlösung pH 4,6 zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, 400 µl des Überstands Phenol/Chloroform-behandelt, die DNA durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol präzipitiert und durch 15 min Zentrifugation bei 13000 g und 4°C sedimentiert. Nach dem Waschen mit 80 % Ethanol wurde die Plasmid-DNA an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. 5 µl der Plasmid-DNA wurden für den Restriktionsverdau eingesetzt.

### Restriktionsverdau von DNA

Optimale Bedingungen für den DNA-Verdau wurden mittels 10xPuffern eingestellt, die von den Vertreibern der Restriktionsenzyme empfohlen wurden. Pro 1 µg DNA wurden 3-5 u Restriktionsenzym eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10-fache der in Glycerin gelösten Enzyme war. Die Dauer des Restriktionverdaus betrug mindestens 2 h bei 37<sup>0</sup>C. Die Verdau-Reaktion wurde mit 1/5 Volumen 5 x Glycerin-Probenpuffer (50 mM EDTA pH 8,0; 50 % Glycerin; 1 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau) abgestoppt.

### Auffüllen von 5'-Überhängen

5'-Überhänge von DNA-Fragmenten wurden in einer Reaktion aufgefüllt, die 1 µg DNA, 1 mM DTT, 0,5 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP; dCTP; dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,6), 1 x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7,5; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl ) und 5 u *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 u/µl) in einem Endvolumen von 20 µl, enthielt. Nach etwa 20 min wurde die Reaktion durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgestoppt.

### Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von kohäsiven DNA-Enden wurden insgesamt 500 ng DNA (gleiche Molarität freier Enden) mit 2 u T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 µl (30 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM rATP) bei 15<sup>0</sup>C über Nacht (oder mind. 6 h) inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

### Punktgerichtete Mutagenisierung

Zur Einführung von Punktmutationen wurde der QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenisierungs-Kit der Firma *Stratagene* laut Herstellerangaben verwendet. Diese Methode erlaubt eine ortsspezifische Mutation in nahezu allen doppelsträngigen Plasmiden und macht damit eine zeitraubende Umklonierung in M13 Bakteriophagen-Vektoren und einzelsträngige DNA überflüssig. Für die Replikation der DNA wird die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, die beide DNA-Stränge mit hoher Genauigkeit (12-mal genauer als *Taq* DNA-Polymerase) amplifiziert. Die Mutation enthaltende Oligonukleotid-Primer, die zu den entgegengesetzten Strängen der DNA komplementär sind, werden während den Replikations-Zyklen durch die *Pfu* DNA-Polymerase verlängert, so daß ein zirkuläres, mutiertes Plasmid mit versetzt angeordneten Einschnitten gebildet wird. Plasmid-DNA wird von nahezu allen *E. coli* Stämmen *dam* methyliert und ist somit von der *in vitro* synthetisierten DNA unterscheidbar. Die ursprüngliche Plasmid-DNA wird anschließend mit der Endonuklease *Dpn* I verdaut. Die

*Dpn* I Endonuklease schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Thermo-Cycler (Crocodile II, Appligene): 10 ng Matrizen-DNA, 1/10 Volumen 10 x Reaktions-Puffer, je 125 ng Oligonukleotidprimer (5'-3' und 3'-5') und 1 µl dNTP-Mix (2,5 mM je NTP) wurden mit Wasser auf das Endvolumen von 50 µl aufgefüllt, 1 µl *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) zugegeben und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 95°C für 30 s, die Primerhybridisierung bei 55°C für 1 min und die DNA-Synthese bei 68°C (als Faustregel gilt, 2 Minuten pro kb Plasmid-Länge). Nach Abschluß der DNA-Synthese wurde auf 37°C abgekühlt, 1 µl *Dpn* I Restriktionsenzym (10 U/µl) zugegeben und 60 min bei 37°C verdaut. Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert und die Plasmid-DNA wurde anschließend in superkompetente Bakterien (Epicurian Coli XL1-Blue) transformiert. Der Erfolg der Mutagenisierung wurde in jedem Fall durch Sequenzierung der klonierten Plasmide überprüft.

### **Herstellung kompetenter Bakterien von *E. coli***

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 2,5 ml einer stationären Kultur von *E. coli* DH5α mit 250 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>550</sub> = 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 7000 g schonend zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml eiskalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, auf 250 ml mit der gleichen Lösung verdünnt und erneut bei 4°C und 7000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in 10 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen, wieder auf 250 ml mit dieser Lösung verdünnt, erneut bei 4°C und 7000 g zentrifugiert und schließlich in 12 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und mit 2 ml 87% Glycerin vorsichtig gemischt. Zur dauerhaften Aufbewahrung der kompetenten Bakterien wurde die Suspension zu je 1 ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C aufgehoben.

### **Transformation kompetenter Bakterien**

Kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis mit einer frischen 1,4 M β-Mercaptoethanol-Lösung vermischt und für 10 min inkubiert. Dann wurden entweder 10 ng Plasmid-DNA oder 5 µl einer Ligationsreaktion zu den Bakterien gegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Bakterien/DNA-Gemisch für 45 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort wieder 2 min auf Eis gestellt. Dann wurde mit 900 µl LB-Medium verdünnt und die Bakterien für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden dann mind. 1/5 der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und bei 37°C bis zum sichtbaren Erscheinen von Bakterienkolonien inkubiert.

### Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der interessierenden DNA-Fragmente wurden 1-2 % Agarose-Gele verwendet. Typischerweise wurde eine entsprechende Menge Agarose Typ II mit 50 ml 1 x TBE (90 mM Tris pH 8,3; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,0) versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Agarose-Lösung entstand. Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) wurde die flüssige Agarose in eine Laufkammer gegeben und ein Kamm zur Aussparung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit Laufpuffer (1 x TBE) überschichtet und die mit Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmente erfolgte meistens zwischen 80 und 120 V. Die DNAs wurden im UV-Durchlicht (320 nm) sichtbar gemacht.

### Isolierung von DNA-Fragmenten

Je nach Größe der zu isolierenden DNA-Fragmente wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

Zur Isolierung von Fragmenten größer als 1000 bp wurde die interessierende Bande im UV-Durchlicht aus dem Gel herauspräpariert und das Gelstück in ein am Boden durchbohrtes 0,5 ml-Reaktionsgefäß, das zur Hälfte mit Plastikwolle bestückt war, gegeben. Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und die DNA-haltige Agarose durch Zentrifugation (13000 g, 10 min) aus der Agarose heraus in das 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde dabei durch die Plastikwolle im oberen Gefäß zurückgehalten. Die gesammelte DNA-TBE-Lösung konnte direkt weiter verwendet werden (z.B. Ligation) oder wurde einer Reinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen.

Kleinere DNA-Fragmente (< 1000 bp) wurden meistens mittels einer DEAE-Membran isoliert. Dazu wurde im UV-Durchlicht mit einem Skalpell unterhalb der interessierenden Bande ein Schlitz eingeschnitten. In diesen Schlitz wurde dann eine DEAE-Membran (NA 45; 0,45 µm; *Schleicher & Schuell*) geeigneter Größe eingeführt und die Elektrophorese solange fortgeführt, bis die DNA-Bande vollständig an die Membran gebunden war. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl Elutionspuffer (1,5 M NaCl; 1 mM EDTA pH 7,8; 10 mM Tris-HCl pH 7,6) für 1 h bei 65°C von der Membran eluiert, mit 1 ml Ethanol gefällt und die präzipitierte, getrocknete DNA in Wasser oder geeignetem Puffer aufgenommen und verwendet.

**Poly (A)<sup>+</sup>mRNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen (Aviv und Leder, 1972; Rahmsdorf et al., 1986)**

Die Zellen wurden bei 300 g abzentrifugiert, einmal mit 10 ml kaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6) gewaschen, erneut abzentrifugiert, das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen, direkt in ein 50 ml *Greiner*- Gefäß pipettiert, in dem 10 ml STE-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5 % SDS; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) mit 300 µg/ml Proteinase K vorlagen und kurz aber kräftig gemischt. Das Lysat wurde anschließend mit einem Ultraturrax-Messerhomogenisator gescheert und für einen Proteinase K-Verdau 30 min bei 37<sup>0</sup>C inkubiert. Das Lysat wurde dann auf 0,5 M NaCl eingestellt und 50-100 mg Oligo (dT)-Zellulose in HSB-Puffer (300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1 % SDS; 10 mM Tris-HCl pH 7,4) zugegeben. Bindung der mRNA an die Oligo (dT)-Zellulose erfolgte durch Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation bei 300 g für zwei Minuten wurde die Oligo (dT)-Zellulose gesammelt und dreimal mit je 10 ml HSB-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Oligo (dT)-Zellulose mehrmals in Wasser resuspendiert, einmal mit 500 µl und 4 mal mit 950 µl, wobei nach jeweiliger Pelletierung der Zellulose, die Überstände, bis auf die ersten 500 µl, in einem auf Eis gekühlten Glasgefäß gesammelt wurden. Die insgesamt 3,8 ml RNA-Eluat wurden noch einmal bei 1600 g für 5 min zentrifugiert, um so Reste von Oligo (dT)-Zellulose zu entfernen. Von diesem Überstand wurden 400 µl zur RNA-Konzentrationsbestimmung verwendet und die restlichen 3,4 ml in ein 15 ml *Falcon*-Gefäß überführt, mit 3 M Natriumazetat-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,2 M eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen eiskalten Ethanol für 16 h bei -20<sup>0</sup>C oder für 4 h bei -80<sup>0</sup>C die RNA präzipitiert. Danach wurde die RNA 20 min bei 14500 g und 4<sup>0</sup>C pelletiert, mit 80 % kaltem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und anschließend unter Vakuum im Exsikkator getrocknet. Die RNA wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 0,5-1 µg/µl eingestellt.

**Auftrennung von RNA im Agarosegel**

RNA wurde durch ein 1 % Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde ein 1 % Agarosegel zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 5 mm dicken Kunststoffabstandhalter gegossen. Der ganze Aufbau wurde zuvor seitlich und unten mit Kunststoffklebeband abgedichtet und am Boden, zur Stabilisierung des Agarosegels, ein Acrylamidkissen gegossen (4 ml deionisiertes Acrylamid: Bisacrylamid (30 : 0,8) mit 20 µl TEMED und 50 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung versetzt). Für das Agarosegel wurden 1 g Agarose Typ II in 100 ml 1 x RNA-Laufpuffer (1 x PB: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,85) in

der Mikrowelle bis zu einer klaren Lösung gekocht. Die auf etwa 70°C abgekühlte Agarose wurde zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm für die Aussparung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erkalten der Agarose wurde der Kamm und die seitlichen und unteren Abdichtungen vorsichtig entfernt, das Gel in eine Vertikal-Gelkammer eingebaut und die Reservoirs mit 1 x RNA-Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 h bei 100-140 V bei 4°C im Kühlraum. Die zu ladende RNA-Menge wurde im Vakuum ("speed vac") getrocknet und in 20 µl Denaturierungspuffer (1 x PB; 50 % DMSO; 5,85 % deionisiertes Glyoxal) sorgfältig gelöst. Nach 10 min Denaturierung bei 55°C und sofortigem Abschrecken auf Eis wurden 5 µl 5 x RNA-Ladepuffer (1 x PB; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) zugegeben und die RNAs in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront 6-8 cm vom Start weggewandert war. Die Gelplatten wurden vom Gel entfernt und dieses etwa 15 min in 300 ml 1 x PB-Lösung mit 20 µg/µl Acridin-Orange gefärbt, anschließend 3 x 15 min mit je 500 ml 1 x PB entfärbt und unter UV-Durchlicht (302 nm) photographiert.

#### **Northern blot : Transfer von RNA auf Nylonmembran**

Die nach Größe aufgetrennte RNA wurde aus dem Gel mittels Kapillarkräften auf eine *Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran transferiert. Dafür wurde das Gel auf 3 Lagen mit 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 6,5) gesättigten *Whatman 3MM*-Papier plaziert, wobei beide Enden der Papierlage in 20 x SSC-Puffer eintauchten. Auf das Gel kam ein seiner Fläche entsprechend große Nylonmembran, 3 Lagen mit 20 x SSC-Puffer gesättigte 3 MM Filterpapiere und ein Stapel Zellstoffhandtücher. Der ganze Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Nach etwa 16 h war die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde dann im *stratalinker 2400* (254 nm, " auto crosslink") mit der RNA-Seite zur UV-Quelle hin bestrahlt und für 2 h bei 80°C inkubiert.

#### **Nachweis spezifischer RNA mit <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Proben (Denhardt, 1966; Alwine et al., 1977)**

Zunächst wurde eine Vorhybridisierung der Nylonmembran durchgeführt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Dazu wurde die Membran für 1 h bei 65°C in 100 ml 4 x SSC, 1 x Denhardt's (0,02 % BSA; 0,02 % Ficoll; 0,02 % PVP), 3,3 % PiPPi (0,2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 0,1 % SDS in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen rotiert. Anschließend wurde für eine weitere Stunde insgesamt 20 µg/ml Heringssperma-DNA dazugegeben. Die Hybridisierungslösung bestand aus der radioaktiven Probe, die zuvor 5 min gekocht und auf Eis abgeschreckt wurde, 0,1 % SDS, 10 mM EDTA und 20 µg/ml Heringssperma-DNA in 10 ml mit Wasser aufgefülltem Volumen. Die

Vorhybridisierungslösung wurde aus der Röhre vollständig dekantiert, die Hybridisierungslösung hineingegeben und für mindestens 16 h im Hybridisierungssofen bei 65°C rotiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit zunehmender Stringenz gewaschen. Zunächst mit Lösung A (2 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), dann Lösung B (1 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) und schließlich Lösung C (0,5 x SSC; 0,1 % SDS; 0,2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 % Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Das Waschen erfolgte in den gleichen Glasröhren, die für die Hybridisierung verwendet wurden, ebenfalls unter Rotieren bei 65°C im Hybridisierungssofen für jeweils 30 min. Die Membran wurde nach dem Waschen in Plastikfolie eingeschweißt und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Für eine mehrmalige Hybridisierung eines Filters wurde dieser 15 min in 0,1 % SSC und 0,5 % SDS gekocht und erneut mit der Vorhybridisierung begonnen.

### **Herstellung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen**

cDNA-Fragmente von Interesse wurden präpariert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem "rediprime"-DNA Markierungs-Kit der Firma *Amersham* nach Angaben des Herstellers. Etwa 20-50 ng DNA in 45 µl Wasser wurden für 5 min gekocht und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde dann in ein vom Hersteller gelieferten Reaktionsgefäß überführt, in dem sich alles für die Markierungsreaktion nötige als Lyophyllisat befand. Nach vollständigem Lösen des Lyophyllisats wurden 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (10 mCi/ml) zugegeben, sorgfältig gemischt und für mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Volumen auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt und nicht polymerisierte Nukleotide durch Gelfiltration (*Sephadex G-50 Matrix*) entfernt. Zur Bestimmung des radioaktiven Einbaus in die Polynukleotidkette wurden 1 µl der nach der Gelfiltration erhaltenen Lösung im Szintillationsmeßgerät gemessen.

### **Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription**

Für die Erststrangsynthese wurden 100 ng poly (A)<sup>+</sup>-mRNA mit 200 ng Oligo (dT)<sub>12</sub> Primer in einem Volumen von 12 µl bei 70°C für 10 min inkubiert und danach auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x Erststrang-Puffer (GibcoBRL), 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (10 mM von dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und 1 µl (200 u) *SUPERSCRIPT<sup>TM</sup>II* (GibcoBRL) wurde bei 42°C für 50 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert.

### **Amplifikation der Erststrang-cDNA mittels PCR**

Es wurden 1 µl Erststrang cDNA mit 1 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer (Pharmacia), je 12.5 pmol 3'-und 5'-Amplifikations-Primer, 1 µl dNTP Mix (2 mM) und 0.5 u *Taq*-DNA-Polymerase mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Amplifikation der Erststrang-cDNA erfolgte durch 35 Zyklen folgender Reaktionsbedingungen: 30 sec 94°C, 1 min, 50°C und 1 min, 72°C

Das PCR-Produkt wurde dann auf einem Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromod-Färbung photographiert.

### **Arbeiten mit Proteinen**

#### **Präparation von Gesamtzell-Proteinextrakten**

Zwischen 2 und 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden bei 300 g gesammelt, einmal mit kaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Waschpuffer wurde sorgfältig entfernt und das Zellpellet in 100-400 µl Lysispuffer (250 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) aufgenommen. Die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen im flüssigen Stickstoff und Eiswasser aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 13000 g und 4°C pelletiert und die klare Proteinlösung in neue Reaktionsgefäße überführt. Alle Schritte erfolgten bei 4°C. DTT und PMSF wurden dem Lysispuffer immer frisch zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach der Lowry-Methode bestimmt.

#### **Präparation von Zytoplasmaextrakten (modifiziert nach Koong et al., 1994)**

Zwischen 2 und 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden bei 300 g gesammelt, einmal mit kaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Zellpellet in 100-200 µl Lysispuffer (20 mM Tris pH 8,0; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 10 % Glycerin; 10 mM NaPPi; 10 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50 µM

ZnCl<sub>2</sub>; 20 mM β-Glycerophosphat; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Aprotinin) aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, kurz aber kräftig gemischt und dann für 15 min auf Eis lysiert. Durch 20 min Zentrifugation bei 13000 g und 4°C wurden die Zellkerne pelletiert und die klaren Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Lowry-Methode bestimmt.

#### **Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Lowry et al. (1951)**

5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 145 µl Lowry I-Lösung (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1 N NaOH) vermischt und 250 µl Lowry IV-Lösung (0,02 % NaK-Tartrat; 0,01 % CuSO<sub>4</sub> in Lowry-I) dazugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 µl Folin-Ciocalteus-Reagenz (1/1 Verdünnung mit Wasser) zupipettiert, gut gemischt und für 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Je 200 µl eines Ansatzes wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion der Lösung bei 600 nm im ELISA-Reader (*Multiskan PLUS MK II*) bestimmt. Als Referenz zur Berechnung der Proteinkonzentrationen dienten definierte Eichlösungen (0-60 µg), die mit Serumalbumin (BSA) angesetzt und parallel angelegt wurden.

#### **Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese (Laemmli et al., 1970) durchgeführt. Im Prinzip wurden dabei Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem höherprozentigen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung (8-12 % Acrylamid; 0,2-0,32 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,05 % TEMED ) wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt waren, gegossen und sogleich mit 2-Propanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das 2-Propanol vollständig dekantiert, die 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) über das Trenngel gegossen und ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glyzin; 0,1 % SDS) gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 2 x Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei Spannungen zwischen 80 und 140 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und ein Teil davon entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. (Western Blot)

### **Western Blot: Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern (Immunoblot-Analyse)**

Eine der Gelfläche entsprechend große PVDF Immobilon<sup>TM</sup>-P Transfermembran (*Millipore*) wurde für einige Sekunden in Methanol getränkt und für weitere 5 min in Wasser inkubiert. Die Membran wurde dann auf drei Lagen mit Transferpuffer (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glyzin; 20 % Methanol) gesättigten *Whatman 3MM*-Papier gelegt. Auf die PVDF-Membran wurde das Gel und drei weitere Lagen *Whatman 3MM*-Papier plaziert. Dieser Aufbau wurde in einen Blotkammereinsatz ("sandwich") verpackt und in die Blotkammer (Trans-Blot, *BioRad*) eingesetzt. Die Elektroden waren dabei so angeordnet, daß die PVDF-Membran zum Pluspol hin gerichtet war. Der Transfer erfolgte für mindestens 4 h bei 300-400 mA und 4<sup>0</sup>C im Kühlraum. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zunächst mit 5 % Magermilch in PBS-Tween (PBST: PBS mit 0,16 % Tween-20) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt, um damit unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen. Die Bindung des für das interessierende Protein spezifischen Antikörpers erfolgte durch Inkubation des Filters mit einer 1/1000-Verdünnung des Antikörpers in 5 % Magermilch-PBS-T, eingeschweißt in Plastikfolie für mindestens eine Stunde unter ständiger Bewegung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Filter dreimal für je 5 min in einem größeren Volumen PBS-T gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1/2000 in 5 % Magermilch-PBS-T) für mindestens 30 min inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch das ECL-System (*Amersham*) nach Hersteller-Angaben. Der Filter wurde dabei für eine Minute mit der ECL-Lösung bedeckt und anschließend unterschiedlich lang gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### **Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteingelen**

Das Gel wurde für mindestens eine Stunde in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50 % Methanol; 7,5 % Essigsäure) inkubiert und anschließend in zwei Schritten entfärbt. Im ersten Schritt wurde das gefärbte Gel für mindestens 30 min in Entfärbelösung I (50 % Methanol; 10 % Essigsäure) geschwenkt und danach solange in Entfärbelösung II gelegt, bis die Proteinbanden klar sichtbar wurden. Zur Dokumentation konnte das Gel auf ein *Whatman 3MM*-Papier gelegt und im Wasserstrahlvakuum getrocknet werden.

## Reporter-Gen-Analysen

### Untersuchung der Genexpression durch Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivitäts-Messung ("CAT-Assay", Gorman et al., 1982)

Zellen, die zuvor mit CAT-Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert worden waren, wurden bei 300 g 4 min abzentrifugiert, einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellpellet, nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes, in 250 mM Tris-HCl pH 7,8 resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen im flüssigen Stickstoff und 37°C-Wasserbad wurden die Zellen aufgebrochen. Die Extrakte wurden durch 20 min Zentrifugation bei 13000 g von Zelltrümmern geklärt und der Proteingehalt des Überstandes nach der Lowry-Methode bestimmt. Für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase eines Proteinextrakts wurden 100-200 µg Protein in einem Reaktionsvolumen von mindestens 100 µl mit 1,5 µl D-Threo-[dichloracetat-1-<sup>14</sup>C]-Chloramphenicol (≅ 5550 pmol, als Substrat) und 1 mM Acetyl-Coenzym A in 250 mM Tris pH 7,8 für 2-24 h bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit 500 µl Ethylacetat kräftig gemischt und damit das Substrat und die Reaktionsprodukte in die obere organische Ethylacetat-Phase ausgeschüttelt. Die Ethylacetat-Phase wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und im Vakuum ("speed vac") eingedampft. Das Lyophilisat wurde dann 18 µl Ethylacetat gelöst, auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen und die Reaktionsprodukte (1'-acetylierten, 3'-acetylierten und die 1',3'-acetylierten Formen des Chloramphenicols) und das Substrat (nicht acetyliertes Chloramphenicol) in einer Chromatographie-Kammer dünnschichtchromatographisch voneinander getrennt. Als Laufmittel wurde ein Chloroform/Methanol Gemisch (9:1) verwendet, die Dauer der Chromatographie betrug typischerweise eine Stunde. Nach der Chromatographie wurden die DC-Platten kurz an der Luft getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Für eine quantitative Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität wurden die DC-Platten mit dem *Fuji Bio-Imaging-Analyzer BAS1.000* ausgewertet. Meistens wurde eine relative CAT-Aktivität bestimmt, die als das Verhältnis von Signalstärke der Reaktionsprodukte zur Summe aus Reaktionsprodukten und nicht umgesetzten Substrats von hundert errechnet wurde ("Umsetzungsprozent").

### **Untersuchung der Genexpression durch Luziferase-Aktivitäts-Messung (Nguyen et al., 1988; Brasier et al., 1989)**

Mit Luziferase-Reportergen-Konstrukten transfizierte Zellen wurden bei 300 g 4 min zentrifugiert, einmal mit PBS ohne Calcium und Magnesium (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,6) gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Entfernen der Waschlösung in 100-200 µl KP-Puffer (25 mM Glycylglycin pH 7,8; 15 mM Kaliumphosphat; 15 mM MgSO<sub>4</sub>; 4 mM EGTA; 2 mM ATP; 1 mM DTT) aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen im flüssigen Stickstoff und 37<sup>0</sup>C-Wasserbad wurden die Extrakte 15 min bei 13000 g und 4<sup>0</sup>C zentrifugiert, der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und sofort die Luziferase-Aktivität der Extrakte bestimmt. Dafür wurde die Hälfte eines Extraktes (maximal 100 µl) mit 25 mM Glycylglycin pH 7,8; 15 mM MgSO<sub>4</sub>; 4 mM EGTA; 1 mM ATP; 1 mM DTT im Luminometer durch Autoinjektion von 1 mM Luziferin-Lösung gemischt und die entstandene Lumineszenz vom Gerät detektiert. Die gemessenen Luziferase-Einheiten wurden gegen die im Anschluß nach der Lowry-Methode bestimmten Proteilmengen normiert.

### **Zellkultur**

Alle Zellen wurden bei 6 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte und 37<sup>0</sup>C in geeigneten Brutschränken kultiviert. Lymphoide (S49.1 und Abkömmlinge) und Fibroblasten- (QE und Abkömmlinge) Zelllinien wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % einer Penicillin/Streptomycinlösung (10000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin) versetzt war, kultiviert.

### **Passagieren von Zellen**

Suspensionskulturen wurden, wenn sie eine Dichte von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml hatten, auf maximal 2 x 10<sup>5</sup> Zellen mit frischem Kulturmedium verdünnt. Adherente Kulturen wurden jeweils vor Erreichen der Konfluenz maximal eins zu zehn verdünnt. Dafür wurde das Kulturmedium sorgfältig entfernt, die Zellen vollständig mit 0,25 % Trypsin bedeckt, das Trypsin sogleich wieder abgesaugt und nach wenigen Minuten die abgelösten Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in gewünschter Zahl auf neue Kulturschalen verteilt. Zellzahlen wurden im allgemeinen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden sie abtrypsiniert, abzentrifugiert (300 x g, 3 min) und in eiskaltem Einfriermedium (DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1,5 ml wurden in ein Einfrierröhrchen (*Wheaton Scientific*, Millville, USA) abgefüllt und zum Abkühlen 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen langsam auf -80°C (möglichst 1°C/min) abgekühlt und am nächsten Tag zur Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300 x g für 3 min) und mit frischem Kulturmedium in geeigneter Verdünnung auf Zellkulturgefäße verteilt.

### **Behandlung von Zellen mit Induktoren**

Zur Behandlung von Zellen mit Dexamethason, RU486, ZKA, ZKB, ZKC, ZKD, 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) und G418 wurden diese Substanzen direkt aus konzentrierten Stammlösungen ins Medium pipettiert und die Kultur für die entsprechenden Inkubationszeiten bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank für Zellen gehalten.

### **Einbringen von DNA in Zellen**

#### **Transiente und stabile Transfektion von Zellen mit DEAE-Dextran (Schwartz et al., 1990)**

Die DEAE-Dextran-Methode wurde zur Transfektion lymphoider Zellen (S49.1, S49.1G3.R1 und deren Abkömmlinge) angewendet. Bei transienter Transfektion wurden die Zellen 24 h vorher auf eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  pro ml eingestellt. Es wurden 5 µg pro  $2 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Die Zellen wurden dafür bei 300 g 4 min abzentrifugiert, einmal mit TBS (137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und die Zellen nach erneuter Zentrifugation in einem 1 x -Transfektionsmix aufgenommen. Der Transfektionsmix bestand aus 5 µg DNA, 0,5 µg/ml DEAE-Dextran in 200 µl TBS. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Zellsuspension 20 µl DMSO zugegeben (Endkonz. 1 %) und für weitere drei min inkubiert. Der "DMSO-Schock" wurde durch Zugabe eines großen Volumens TBS gestoppt, die Zellen einmal mit TBS gewaschen und in frischem vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen. Die Behandlung der Zellen mit Induktoren erfolgte frühestens 16 h nach Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wurde wie bei der transienten verfahren, die Zellen wurden 16 h nach Transfektion mit dem geeigneten Antibiotikum behandelt. Nach Einsetzen der Antibiotika-Wirkung wurde die Kultur auf "24-well-Gefäße" verteilt und gewartet, bis antibiotikaresistente Kulturen hochgewachsen waren. Um Einzelklone zu isolieren, wurden

antibiotikaresistente (polyklonale) Kulturen in verschiedenen Verdünnungen (z.B. 1, 5, 10 pro well) auf "96-well-Platten" verteilt. Bei "96-well-Platten", wo in weniger als 2/3 der wells Zellen wuchsen, handelte es sich mit hinreichender Wahrscheinlichkeit um Einzelklone. Diese wurden vermehrt und analysiert.

### **Transiente und stabile Transfektion mit Kalziumphosphat (Graham und van der Eb, 1973)**

Die  $\text{CaPO}_4$ -Methode wurde zur transienten und stabilen Transfektion von Fibroblasten-Zelllinien ( $\Omega\text{E}$  und Abkömmlinge) verwendet. Dazu wurden  $10^6$  Zellen einen Tag vor der Transfektion in eine 9 cm Petrischale ausgesät. Ein einfacher Transfektionsmix wurde folgendermaßen hergestellt: Zu 10  $\mu\text{g}$  DNA in 500  $\mu\text{l}$  einer 250 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde tropfenweise 500  $\mu\text{l}$  2 x HBS-Lösung (280 mM NaCl; 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 50 mM HEPES pH 7,05) zugegeben und kurz gemischt. Nach etwa 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das  $\text{CaPO}_4$ -DNA-Kopräzipitat (sichtbar durch leichte Trübung der Lösung) tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach 4-16 h Inkubation im Brutschrank für Zellen wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,6) gewaschen und frisches vorgewärmtes Medium dazugegeben. Bei transienter Transfektion wurden die Zellen etwa 24 h nach Transfektion mit Induktoren behandelt. Für eine stabile Transfektion von Zellen wurde ähnlich der transienten verfahren, nur daß weniger Zellen ( $5 \times 10^5$ ) pro 9 cm Petrischale ausgesät und diese 24 h nach der Transfektion auf drei 9 cm Schalen gesplittet wurden. Dem frischen Kulturmedium war dabei das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Einzelne Kolonien Antibiotika-resistenter Zellen wurden etwa drei Wochen nach Selektionsbeginn makroskopisch sichtbar. Eine gewisse Anzahl von Kolonien wurde isoliert, indem man zunächst das Kulturmedium sorgfältig entfernte, die Kolonie mit einem Tropfen 0,25 % Trypsin bedeckte und nach einigen Sekunden vorsichtig mit einer Pipette aufnahm. Die so isolierten Klone wurden vermehrt und analysiert.

### **Retrovirale Infektion von S49.1G3.R1 mit Hilfe des OmegaE-Systems (Morgenstern und Land, 1990)**

In einer 750 ml Kulturflasche wurden  $5 \times 10^6$   $\Omega\text{E}$ -Zellen, die entweder mit pBrGR oder pBrGR-LS-7 stabil transfiziert waren, in 20 ml Medium angesetzt. Nach Anhaften der Zellen wurden zusätzlich  $2 \times 10^6$  S49.1G3.R1-Zellen in 10 ml Medium dazugegeben und für zwei Wochen kokultiviert. Die Selektion mit Puromycin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurde zwei Tage nach Anfang der Kokultur begonnen. Während der Kokultur wurde auf optimale Wachstumsbedingungen

beider Zelllinien geachtet, die  $\Omega$ E-Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz und die S49.1G3.R1-Zellen bei einer Zelldichte von etwa  $2 \times 10^6$  pro ml verdünnt. Nach Ende der Kokultur wurde die Zellsuspension in eine frische Petrischale überführt und für einige Stunden im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich in der Suspension befindliche  $\Omega$ E-Zellen abgesetzt hatten, wurde der nun fast ausschließlich aus S49.1G3.R1-Zellen bestehende Pool zur Klonierung in verschiedenen Verdünnungen auf "96-well-Platten" verteilt, vermehrt und auf Expression der infizierten cDNA getestet.

## **Apoptose-und Zellzyklus-Bestimmungen**

### **Detektion apoptotischer Zellen durch Annexin V-Bindung (Martin et al., 1995)**

Etwa  $10^6$  Zellen wurden einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,6) und Annexin-Inkubationspuffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  Färbelösung (2  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC-Stammlösung in 100  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer) resuspendiert. Nach etwa 15 min Inkubation bei RT wurde die Inkubationsreaktion auf 500  $\mu\text{l}$  Volumen mit Inkubationspuffer verdünnt und anschließend die Anzahl apoptotischer Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Der Inkubationspuffer des Verdünnungsschrittes enthielt 1 mg/ml Propidiumjodid (PI), was die Unterscheidung nekrotischer von apoptotischen Zellen möglich machte. FITC-Fluoreszenz wurde mit 488 nm angeregt und bei 515 nm detektiert. Um PI-Fluoreszenz bei 560 nm zu detektieren, wurde eine elektronische Kompensation durchgeführt, dies schloß eine Überlappung der beiden Emissionsspektren aus.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten (Herrmann et al., 1994)**

Etwa  $5 \times 10^6$  Zellen wurden einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,6) gewaschen, das Zellpellet für 10 Sekunden mit 50  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (1% NP-40; 20 mM EDTA; 50 mM TrisHCl pH 7,5) behandelt und die Kerne bei 1600 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der Lysisschritt noch ein Mal wiederholt. Die insgesamt 100  $\mu\text{l}$  Überstand wurden auf 2 % SDS und 5 mg/ml RNase A eingestellt und für mindestens 2 h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Proteinase K behandelt (Endkonzentration 2,5 mg/ml) und für mindestens zwei weitere Stunden bei 37°C inkubiert. Der Proteinase K-Verdau wurde mit 1/10 Volumen 10 M Ammoniumacetat versetzt und die DNA durch Zugabe von 2,5-fachem Volumen Ethanol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wurde durch 20 min Zentrifugation bei 13000 g gesammelt, getrocknet und in 20  $\mu\text{l}$  DNA-Ladepuffer aufgenommen. Die

Auftrennung der DNA erfolgte mittels eines 1,8 % TAE-Agarosegels bei 80 V für etwa 3 h. Die DNA wurde nach der Elektrophorese durch 15 min Inkubation des Gels in Ethidiumbromid-haltigem TAE-Puffer sichtbar gemacht.

**Analyse der Zellzyklusverteilung von Zellen mittels Propidiumjodid, Bestimmung apoptotischer "sub G0/G1"-Zellen (Telford et al., 1992)**

Etwa  $10^6$  Zellen wurden einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,6) gewaschen und in 200  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden dann 800  $\mu\text{l}$  80 % Ethanol,  $4^\circ\text{C}$  pipettiert und vorsichtig gemischt. Die so fixierten Zellen wurden über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Färbung mit Propidiumjodid (PI) wurden die fixierten Zellen bei 360 g abzentrifugiert und in 1 ml Färbelösung (50  $\mu\text{g}$  PI, 0,1 mg/ml RNase A in 0,1 % NP-40 und 0,1 % NaCitrat) resuspendiert und nach ungefähr 30 min Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln durchflußcytometrisch analysiert.

**Cdk2-Aktivitätsmessung ("Kinase-Assay", Matsushime et al., 1994)**

Etwa  $10^7$  S49.1 wurden einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,6) gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 0,1 % Tween 20 in 10 % Glycerin; frisch: 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin; 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) resuspendiert und unter Kühlung 2 mal 5 Sekunden sonifiziert. Anschließend wurden die Extrakte bei 13000 g, 5 min von Zelltrümmern geklärt. Vom Überstand wurden 50  $\mu\text{l}$  als Zellysat weiter verwendet und die restlichen 450  $\mu\text{l}$  mit 20  $\mu\text{l}$  Protein-A-Sepharose (in Lysispuffer resuspendiert) gemischt und zur Reinigung der Extrakte von unpezifisch an die Sepharose bindenden Molekülen eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  rotiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 360 g wurde der Überstand zu 5  $\mu\text{l}$  cyc E-Antikörper (M20, Santa Cruz, Heidelberg) gegeben und über Nacht (mind. 4 Stunden) bei  $4^\circ\text{C}$  rotiert. Danach wurden zur Isolierung der Immunkomplexe die Extrakte mit 20  $\mu\text{l}$  Protein-A-Sepharose versetzt und eine weitere Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  rotiert. Die Protein-A-Sepharose mit gekoppelten cyc E-Immunkomplexen wurde bei 360 g 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Spritze entfernt und verworfen und insgesamt zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit Kinasepuffer (50 mM Hepes, pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat und 2,5 mM EGTA; immer frisch: 1 mM DTT; 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 1 mM NaF und 20  $\mu\text{M}$  ATP) gewaschen (dazwischen immer wieder bei 360 g pelletiert und

## *Material und Methoden*

Waschlösung mit Spritze abgenommen). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand sehr sorgfältig mit einer feinen Spritze entfernt und die Protein-A-Sepharose mit 25  $\mu$ l Kinase-Reaktionspuffer, versetzt mit 4  $\mu$ l[ $\gamma$ -32 P]ATP (10  $\mu$ Ci) und 4  $\mu$ l Histon H1 (1  $\mu$ g; Boehringer, Mannheim) vorsichtig aufgenommen (mit Spitze mischen). Nach 30 min bei 30°C unter Schütteln wurde die Kinasereaktion kurz zentrifugiert und der Überstand zu 25  $\mu$ l 2 x Laemmli pipettiert (unbedingt Protein-A-Sepharose-Kontamination vermeiden!). Die pelletierte Protein-A-Sepharose wurde mit 100  $\mu$ l 2 x Laemmli versetzt. Die Kinasereaktion wurde durch 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel, nach Trocknen auf Whatman-Papier gegen einen Film für mehrere Stunden exponiert. Die Immunoprecipitation durch 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung	E <sub>260</sub> , E <sub>280</sub>	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
AF-1	Aktivierungsfunktion 1	E.coli	Escherichia coli
AF-2	Aktivierungsfunktion 2	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AP-1	Aktivator-Protein 1	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat	EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Amino-ethylether) -Tetraessigsäure
AS	Aminosäuren	et al.	et alii (und andere)
ATP	Adenosinriphosphat	EtOH	Ethanol
bp	Basenpaare	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
BSA	Rinderserumalbumin	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
c	zellulär	FCS	Fötale Kälberserum
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	FITC	Fluoro-Isothiocyanat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase	g	Gramm
CBP	CREB-Bindeprotein	g	relative Erdbeschleunigung
cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>	G418	Gentamycin
cdk2	<i>cyclin dependent kinase 2</i>	GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
cdk4	<i>cyclin dependent kinase 4</i>	GR	Glucocorticoidrezeptor
cdk6	<i>cyclin dependent kinase 6</i>	GRE	<i>glucocorticoid response element</i>
cDNA	zur RNA komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA	GRU	<i>glucocorticoid response unit</i>
Ci	Curie	h	Stunde
cm	Zentimeter	HAT	Histonazetyltransferase
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )	HBD	Hormon-Bindedomäne
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>	hef-1	<i>human elongation factor 1</i>
C-Terminus	Carboxyterminus	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
cyc A	<i>cyclin A</i>	HRE	<i>hormone response element</i>
cyc B	<i>cyclin B</i>	HRU	<i>hormone response unit</i>
cyc D3	<i>cyclin D3</i>	Hsp	Hitzeschockprotein
cyc E	<i>cyclin E</i>	IκB	NF-κB-Inhibitor
dATP	2'-Deoxyadenosinriphosphat (analog: dCTP, dGTP, dTTP)	ICAM	<i>Intracellular cell adhesion molecule</i>
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosinriphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP)	IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i>
DBD	DNA-Bindedomäne	IκB	NF-κB-Inhibitor
DEPC	Diethylpyrocarbonat	IL-2	Interleukin 2
Dex	Dexamethason	IL-4	Interleukin 4
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium	IL-6	Interleukin 6
DMSO	Dimethylsulfoxid	JNK	cJun-N-terminale Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	KAc	Kaliumacetat
DTT	Dithiothreitol	kb	Kilobasen (1000 Basen)
E	Extinktion	kDa	Kilodalton
		l	Liter
		LBD	ligandenbindende Domäne
		LTR	<i>long terminal repeat</i>

## Abkürzungen

MBq	Megabequerel	M	molar
mCi	Millicurie	mA	Milliampere
mg	Milligramm	pmol	Pikomol
µg	Mikrogramm	PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
min	Minuten	PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
ml	Milliliter	Rb	Retinoblastom
µl	Mikroliter	RLU	relative light units
mM	millimolar	RNA	Ribonukleinsäure
µM	mikromolar	RNase	Ribonuklease
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus	RSV	Rous Sarkoma Virus
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure	SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
mRNA	Boten-RNA	SDS	Natriumdodecylsulphat
Na-Acetat	Natriumacetat	sec	Sekunden
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>	SSC	<i>standard saline citrate</i>
ng	Nanogramm	τ1	Tabelle
nGRE	negativ auf Glukokortikoide reagierendes Element	τ2	Transaktivierungsfunktion 1
nM	nanomolar	Tab.	Transaktivierungsfunktion 2
nm	Nanometer	TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
nt	Nucleotide	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
NP-40	Nonidet P-40	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
N-Terminus	Aminoterminus	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
OD	optische Dichte	TRE	TPA-reagierendes Element
PARP	Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	tRNA	Transfer-RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	U	Enzymeinheiten (Units)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	UV	Ultraviolette Strahlung
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>	V	Volt
PEP	Phosphoenolpyruvat	v/v	Volumen pro Volumen
PKC	Proteinkinase C	wt	Wildtyp
		w/v	Masse pro Volumen

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

## Literatur

- Adachi, M., Sekiya, M., Torigoe, T., Takayama, S., Reed, J.C., Miyazaki, T., Minami, Y., Taniguchi, T. and Imai, K. (1996). Interleukin-2 (IL-2) upregulates BAG-1 gene expression through serine- rich region within IL-2 receptor beta c chain. *Blood*, **88**: 4118-4123.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**: 5350-5354.
- Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**: 129-157.
- Angel, P. (1994) General structure of AP-1 subunits and characteristics of the Jun proteins. In Angel, P. und Herrlich, P. (eds.), *The Fos and Jun families of transcription factors*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-14.
- Aviv, H. and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **69**: 1408-1412.
- Auphan, N., Di Donato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A. und Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, **270**: 286-290.
- Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C. und Comoglio, P.M. (1996). HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J.*, **15**: 6205-6212.
- Baulieu, E.-E. und Kelly, P.A. (1990) *Hormones : from molecules to disease*. Hermann; Chapman und Hall, Paris, New York.
- Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **83**: 851-857.
- Beg, A.A. und Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha- induced cell death. *Science*, **274**: 782-784.
- Boumpas, D.T., Paliogianni, F., Anastassiou, E.D. und Balow, J.E. (1991). Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol*, **9**: 413- 423.
- Brasier, A.R., Tate, J.E. and Habener, J.F. (1989). Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*, **7**: 1116-1122.
- Brennan, P., Babbage, J.W., Burgering, B.M., Groner, B., Reif, K. und Cantrell, D.A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity*, **7**: 679-689.
- Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., Van de Stolpe, 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. *Mol. Endocrinol.*, **9**: 401-412.

Caron-Leslie, L.A., Evans, R.B. und Cidlowski, J.A. (1994). Bcl-2 inhibits glucocorticoid-induced apoptosis but only partially blocks calcium ionophore or cycloheximide-regulated apoptosis in S49 cells. *Faseb J.*, **8**: 639-645.

Casciola-Rosen, L., Nicholson, D.W., Chong, T., Rowan, K.R., Thornberry, N.A., Miller, D.K. und Rosen, A. (1996). Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.*, **183**: 1957-1964.

Cato, A.C.B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis, P. und Ponta, H. (1988). DNA sequences outside the receptor-binding sites differentially modulate the responsiveness of the mouse mammary tumour virus promoter to various steroid hormones. *EMBO J.*, **7**: 1403-1410.

Cato, A.C. und Wade, E. (1996). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*, **18**: 371-378.

Cha, H.H., Cram, E.J., Wang, E.C., Huang, A.J., Kasler, H.G. und Firestone, G.L. (1998). Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 1998-2007.

Chao, D.T. und Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, **16**, 395-419.

Chapman, M.S., Askew, D.J., Kuscuoglu, U. und Miesfeld, R.L. (1996). Transcriptional control of steroid-regulated apoptosis in murine thymoma cells. *Mol. Endocrinol.*, **10**: 967-978.

Cohen, J.J. und Duke, R.C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.*, **132**: 38-42.

Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. und 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.

Coleman, R.E. (1992). Glucocorticoids in cancer therapy. *Biotherapy*, **4**: 37-44.

Cram, E.J., Ramos, R.A., Wang, E.C., Cha, H.H., Nishio, Y. und Firestone, G.L. (1998). Role of the CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 2008-2014.

Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F. und Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**: 9991-9995.

Cryns, V. und Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.*, **12**: 1551-1570.

Denhardt, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**: 641-646.

DeRijk, R. und Sternberg, E.M. (1997). Corticosteroid resistance and disease. *Ann. Med.*, **29**: 79- 82.

- DeVita, V.T., Jr., Hubbard, S.M. und Longo, D.L. (1987). The chemotherapy of lymphomas: looking back, moving forward--the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.*, **47**: 5810-5824.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. und Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*, **249**: 1266-1272.
- Dieken, E.S. und Miesfeld, R.L. (1992). Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 589-597.
- Farrow, S.N. und Brown, R. (1996). New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**: 45-49.
- Fassati, A., Takahara, Y., Walsh, F.S. und Dickson, G. (1994). Production of high titre helper-free recombinant retroviral vectors by lipofection. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 1117-1118.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 1431-1442.
- Gehring, U., Ulrich, J. und Segnitz, B. (1982). Lymphoma cell variants of decreased glucocorticoid sensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **28**: 605-611.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. und Howard, B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**: 1044-1051.
- Gotoh, N., Tojo, A. und Shibuya, M. (1996). A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *EMBO J.*, **15**: 6197-6204.
- Göttlicher, M., Heck, S., Doucas, V., Wade, E., Kullmann, M., Cato, A.C., Evans, R.M. und Herrlich, P. (1996). Interaction of the Ubc9 human homologue with c-Jun and with the glucocorticoid receptor. *Steroids*, **61**: 257-262.
- Göttlicher, M., Heck, S. und Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action [In Process Citation]. *J. Mol. Med.*, **76**: 480-489.
- Graham, F.L. und Eb, A.J.v.d. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**: 456-467.
- Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**: 56-64.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. und 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.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P. und Cato, A.C. (1997). I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, **16**: 4698-4707.
- Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C. und Karin, M. (1995). Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, **14**: 452-460.

Hench, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H. und Polley, H.F. (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis: preliminary report. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.* **24**: 181-197.

Hengst, L. und Reed, S.I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, **271**: 1861-1864.

Herrmann, M., Lorenz, H.M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W. und Kalden, J.R. (1994). A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 5506-5507.

Ishizuka, T., Sakata, N., Johnson, G.L., Gelfand, E.W. und Terada, N. (1997). Rapamycin potentiates dexamethasone-induced apoptosis and inhibits JNK activity in lymphoblastoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**: 386-391.

Israel, N., Gougerot-Pocidallo, M.A., Aillet, F. and Virelizier, J.L. (1992). Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kappa B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J. Immunol.*, **149**: 3386-3393.

Jacobson, M.D., Weil, M. und Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**: 347-354.

Jeon, S.H., Kang, M.G., Kim, Y.H., Jin, Y.H., Lee, C., Chung, H.Y., Kwon, H., Park, S.D. und Seong, R.H. (1997). A new mouse gene, SRG3, related to the SWI3 of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for apoptosis induced by glucocorticoids in a thymoma cell line. *J. Exp. Med.*, **185**: 1827-1836.

Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **62**: 1189-1204.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. und Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, **85**: 403-414.

Karin, M. und Saatcioglu, F. (1997) Negative Transcriptional Regulation by the Glucocorticoid Receptor Is Responsible for the Anti-inflammatory Activity of Glucocorticoids. In Schleimer, R., P. (ed.) *Inhaled glucocorticoids in asthma*, New York, pp. 29-52.

Karin, M. (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? [comment]. *Cell*, **93**: 487-490.

Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A.N., Li, Z., Cowan, K.H. und Seth, P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.*, **57**: 5441-5445.

Kato, J.Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. und Sherr, C.J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, **79**: 487-496.

King, K.L. und Cidlowski, J.A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 601-617.

King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M. und Kirschner, M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, **274**: 1652-1659.

- Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. und Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, **85**: 721-732.
- Koong, A.C., Chen, E.Y. and Giaccia, A.J. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res.*, **54**: 1425-1430.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1992). Interference between pathway-Kullmann, M., Schneikert, J., Moll, J., Heck, S., Zeiner, M., Gehring, U. und Cato, A.C. (1998). RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis [In Process Citation]. *J. Biol. Chem.*, **273**: 14620-14625.
- Kwon, T.K., Nagel, J.E., Buchholz, M.A. und Nordin, A.A. (1996). Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene*, **180**: 113-120.
- Kwon, T.K., Buchholz, M.A., Ponsalle, P., Chrest, F.J. and Nordin, A.A. (1997). The regulation of p27Kip1 expression following the polyclonal activation of murine G0 T cells. *J. Immunol.*, **158**: 5642-5648.
- Kwon, T.K., Buchholz, M.A., Ponsalle, P., Chrest, F.J. and Nordin, A.A. (1997). The regulation of p27Kip1 expression following the polyclonal activation of murine G0 T cells. *J. Immunol.*, **158**: 5642-5648.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A. und Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.*, **11**: 847-862.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamberts, S.W. (1996). The glucocorticoid insensitivity syndrome. *Horm. Res.*, **45**: 2-4.
- Leung, D.Y., de Castro, M., Szeffler, S.J. and Chrousos, G.P. (1998) Mechanisms of glucocorticoid-resistant asthma. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 735-746.
- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E.W., Clurman, B.E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J.M. und Ross, R. (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*, **1**: 553-563.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. und Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**: 565-576.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randell, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lucas, P.C. und Granner, D.K. (1992). Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem*, **61**: 1131-1173.
- Lucibello, F.C., Slater, E.P., Jooss, K.U., Beato, M. und 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.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., La Face, D.M. und Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, **182**: 1545-1556.

Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. und Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 2066-2076.

McConkey, D.J., Hartzell, P., Amador-Perez, J.F., Orrenius, S. and Jondal, M. (1989). Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, **143**: 1801-1806.

Memon, S.A., Moreno, M.B., Petrak, D. und Zacharchuk, C.M. (1995). Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J. Immunol.*, **155**: 4644-4652.

Miyashita, T. und Reed, J.C. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.*, **52**: 5407-5411.

Monfar, M. und Blenis, J. (1996). Inhibition of p70/p85 S6 kinase activities in T cells by dexamethasone. *Mol. Endocrinol.*, **10**: 1107-1115.

Morgenstern, J.P. und Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 3587-3596.

Nasmyth, K. (1996). Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, **274**: 1643-1645.

Nguyen, V.T., Morange, M. and Bensaude, O. (1988). Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.*, **171**: 404-408. Nicholson, D.W. und Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, **22**: 299-306.

Ning, Y.M. und Sanchez, E.R. (1993). Potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by the immunophilin ligands FK506 and rapamycin. *J. Biol. Chem.*, **268**: 6073-6076.

Nordeen, S.K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques*, **6**: 454-458.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R. und Roberts, J.M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*, **372**: 570-573.

Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. und Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, **269**: 682-685.

Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. und Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, **8**: 9-22.

Rahmsdorf, H.J., Harth, N., Eades, A.M., Litfin, M., Steinmetz, M., Forni, L. und Herrlich, P. (1986). Interferon-gamma, mitomycin C, and cycloheximide as regulatory agents of MHC class II-associated invariant chain expression. *J. Immunol.*, **136**: 2293-2299.

- Ramalingam, A., Hirai, A. und Thompson, E.A. (1997). Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation and regulation of the cyclin kinase inhibitor p21Cip1. *Mol. Endocrinol.*, **11**: 577-586.
- Ramos, R.A., Nishio, Y., Maiyar, A.C., Simon, K.E., Ridder, C.C., Ge, Y. und Firestone, G.L. (1996). Glucocorticoid-stimulated CCAAT/enhancer-binding protein alpha expression is required for steroid-induced G1 cell cycle arrest of minimal-deviation rat hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 5288-5301.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. und Schutz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival [see comments]. *Cell*, **93**: 531-541.
- Reisman, D. und Thompson, E.A. (1995). Glucocorticoid regulation of cyclin D3 gene transcription and mRNA stability in lymphoid cells. *Mol. Endocrinol.*, **9**: 1500-1509.
- Reynisdottir, I. und Massague, J. (1997). The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.*, **11**: 492-503.
- Rhee, K., Bresnahan, W., Hirai, A., Hirai, M. und Thompson, E.A. (1995). c-Myc and cyclin D3 (CcnD3) genes are independent targets for glucocorticoid inhibition of lymphoid cell proliferation. *Cancer Res.*, **55**: 4188-4195.
- Rhee, K., Reisman, D., Bresnahan, W. und Thompson, E.A. (1995). Glucocorticoid regulation of G1 cyclin-dependent kinase genes in lymphoid cells. *Cell Growth Differ.*, **6**: 691-698.
- Rinkenberger, J.L. und Korsmeyer, S.J. (1997). Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**: 589-596.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M. und Garabedian, M.J. (1997). Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 3181-3193.
- Sakai, D.D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A., Rottman, F.M. und Yamamoto, K.R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.*, **2**: 1144-1154.
- Salomons, G.S., Brady, H.J., Verwijs-Janssen, M., Van Den Berg, J.D., Hart, A.A., Van Den Berg, H., Behrendt, H., Hahlen, K. und Smets, L.A. (1997). The Bax alpha:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. *Int. J. Cancer*, **71**: 959-965.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defosse, P.A., Klocker, H., Launoit, Y. und 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. und Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, **62**: 1217-1226.
- Schwartz, O., Virelizier, J.L., Montagnier, L. und Hazan, U. (1990). A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene*, **88**: 197-205.
- Schwartzman, R.A. und Cidlowski, J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, **14**: 133-151.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. und Clurman, B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.*, **11**: 1464-1478.

Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, **79**: 551-555.

Shi, Y., Frankel, A., Radvanyi, L.G., Penn, L.Z., Miller, R.G. und Mills, G.B. (1995). Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res.*, **55**: 1982-1988.

Sibley, C.H. und Tomkins, G.M. (1974-I). Isolation of lymphoma cell variants resistant to killing by glucocorticoids. *Cell*, **2**: 213-220.

Sibley, C.H. und Tomkins, G.M. (1974-II). Mechanisms of steroid resistance. *Cell*, **2**: 221-227.

Smets, L.A., Van den Berg, J., Acton, D., Top, B., Van Rooij, H. and Verwijns-Janssen, M. (1994). BCL-2 expression and mitochondrial activity in leukemic cells with different sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood*, **84**: 1613-1619.

Stein, B. and Yang, M.X. (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 4971-4979.

Strasser, A., Huang, D.C. and Vaux, D.L. (1997). The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1333**: F151-178.

Struhl, K. and Moqtaderi, Z. (1998). The TAFs in the HAT [comment]. *Cell*, **94**: 1-4.

Takahashi, A. und Earnshaw, W.C. (1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**: 50-55.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. und Reed, J.C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, **80**: 279-284.

Telford, W.G., King, L.E. und Fraker, P.J. (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, **13**: 137-143.

Thomas, G. und Hall, M.N. (1997). TOR signalling and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**: 782-787.

Thulasi, R., Harbour, D.V. und Thompson, E.B. (1993). Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18306-18312.

Torchia, J., Glass, C. und Rosenfeld, M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**: 373-383.

Toyoshima, H. und Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**: 67-74.

Tuosto, L., Cundari, E., Montani, M.S. und Piccolella, E. (1994). Analysis of susceptibility of mature human T lymphocytes to dexamethasone-induced apoptosis. *Eur J. Immunol.*, **24**: 1061-1065.

Vacca, A., Felli, M.P., Farina, A.R., Martinotti, S., Maroder, M., Screpanti, I., Meco, D.,

- Petrangeli, E., Frati, L. and Gulino, A. (1992). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J. Exp. Med.*, **175**: 637-646.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. und Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*, **274**: 787-789.
- van Daalen Wetters, T. and Coffino, P. (1987). Cultured S49 mouse T lymphoma cells. *Methods Enzymol.*, **151**: 9-19.
- Vayssiere, B.M., Dupont, S., Choquart, A., Petit, F., Garcia, T., Marchandeu, C., Gronemeyer, H. und Resche-Rigon, M. (1997). Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol. Endocrinol.*, **11**: 1245-1255.
- Vlach, J., Hennecke, S. und Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.*, **16**: 5334-5344.
- Wang, H.G., Rapp, U.R. und Reed, J.C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, **87**: 629-638.
- Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R. und Reed, J.C. (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**: 7063-7068.
- Wang, X., Gorospe, M., Huang, Y. und Holbrook, N.J. (1997). p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene*, **15**: 2991-2997.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**: 323-330.
- Wesselborg, S., Janssen, O. and Kabelitz, D. (1993). Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.*, **150**: 4338-4345.
- Wertz, I.E. und Hanley, M.R. (1996). Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.*, **21**: 359-364.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.*, **10**: 1-15.
- Wu, M., Arsura, M., Bellas, R.E., FitzGerald, M.J., Lee, H., Schauer, S.L., Sherr, D.H. und Sonenshein, G.E. (1996). Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 5015-5025.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R.E., Schauer, S.L., Arsura, M., Katz, D., FitzGerald, M.J., Rothstein, T.L., Sherr, D.H. und Sonenshein, G.E. (1996). Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.*, **15**: 4682-4690.
- Wulczyn, F.G., Krappmann, D. und Scheidereit, C. (1996). The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.*, **74**: 749-769.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**: 555-556.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. und 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.

## *Literatur*

Zeiner, M. und Gehring, U. (1995). A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**: 11465-11469.

Zhou, F. und Thompson, E.B. (1996). Role of c-jun induction in the glucocorticoid-evoked apoptotic pathway in human leukemic lymphoblasts. *Mol. Endocrinol.*, **10**: 306-316.