

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6587

Identifizierung von zusätzlichen Proteinen, die an der Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 durch den Glukokortikoidrezeptor beteiligt sind

Sandra Schneider

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität
Stuttgart genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2001

Identifizierung von zusätzlichen Proteinen, die an der Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 durch den Glukokortikoidrezeptor beteiligt sind

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Sandra Schneider
aus Mönsheim

Hauptberichter: Prof. Dr. P. Scheurich
Mitberichter: Prof. Dr. P. Herrlich
Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2000

Institut für Zellbiologie und Immunologie
der Universität Stuttgart

Zusammenfassung

Glukokortikoide finden aufgrund ihrer anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung eine breite therapeutische Anwendung. Die Wirkung von Glukokortikoiden wird in der Zelle durch den Glukokortikoidrezeptor vermittelt, der als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor die Expression von Genen in verschiedenster Weise beeinflussen kann.

Zum einen bindet der GR an DNA-Sequenzen in den Promotoren hormoninduzierbarer Gene und aktiviert die Transkription dieser Zielgene. Zum anderen ist der GR auch in der Lage die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und NF- κ B durch eine Protein-Protein-Wechselwirkung zu hemmen. Die Repression immunregulatorischer Gene ist vermutlich die molekulare Grundlage der immunsuppressiven Wirkung von Cortison.

Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, daß eine simple AP-1-GR Interaktion zur Erklärung dieser Repression nicht ausreicht, sondern daß an der AP-1 Repression durch den GR noch weitere Proteine beteiligt sind.

Das Ziel dieser Arbeit war zusätzliche Faktoren der AP-1 Repression durch den GR zu identifizieren. Sie sollten in der Hefe mit Hilfe eines Zwei-Hybrid Systems als Glukokortikoidrezeptor interagierende Proteine identifiziert werden. Hierzu wurde eine transkriptionell inaktive GR-Mutante hergestellt, deren Repressionkapazität nicht beeinflußt war. Durch den Two-Hybrid Screen wurden bisher unbekannte Proteine isoliert, die hormonabhängig mit dem GR interagieren. Eines dieser Isolate, Trip6, wurde bereits früher als Partnerprotein des ebenfalls AP-1 reprimierenden Thyroidhormon- bzw. des Retinsäurerezeptors RXR identifiziert. In dieser Arbeit erfolgte die funktionelle Charakterisierung des Trip6-Proteins. Trip6 ist ein hauptsächlich nukleäres Protein und existiert in verschiedenen Spleißformen. Trip6 enthält in seinem C-Terminus drei Lim-Domänen, die als Oberflächen für die Interaktion mit weiteren Proteinen dienen können. Neben der Interaktion mit dem GR ist Trip6 auch in der Lage mit der AP-1 Komponente cFos und der NF- κ B Untereinheit RelA zu interagieren. Zudem ist Trip6 ein effektiver transkriptioneller Repressor, der keine Homologie zu bisher beschriebenen Kofaktoren des GR hat. Die Erniedrigung der endogenen Trip6-Proteinmenge zeigte, daß Trip6 eine zentrale Rolle für die AP-1 Repression spielt.

Zusammenfassend ergibt sich für die AP-1 Repression das folgende Modell; durch die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes zwischen AP-1, GR und Trip6, bringt Trip6 seine Repressorfunktion in die direkte Umgebung von AP-1 und hemmt somit dessen transkriptionelle Aktivität. Da Trip6 auch mit RelA interagieren kann, könnte Trip6 ein genereller Faktor für die Repression über Protein-Protein-Wechselwirkungen darstellen.

Diese Arbeit trägt nicht nur zu einem detaillierteren mechanistischen Verständnis der GR abhängigen AP-1 Repression bei, sondern definiert auch eine neue Klasse von Kofaktoren des GR.

Identification of novel cofactors involved in AP-1 repression by the glucocorticoid receptor

Abstract

Glucocorticoids are widely used as anti-inflammatory and immunosuppressive drugs. Within the cell they bind to the Glucocorticoid receptor (GR), a ligand-dependent transcription factor (TF), which is able to modulate gene expression in various ways. Firstly, GR is able to bind directly to DNA sequences in the promoter region of hormone-inducible target genes. Secondly, GR is also able to inhibit transcriptional activity of other TFs like AP-1 and NF- κ B. The repression of immunoregulatory genes by GR presumably is the molecular basis of the immunosuppressive effects of cortison.

The negative crosstalk presumably involves protein-protein-interactions of GR and the other TFs. Up to know there is strong evidence that a direct binding of GR and AP-1 is not sufficient, but that additional factors are involved in the negative crosstalk.

The aim of this work was to identify the additional factors for AP-1 repression. To isolate these factors, a Two-Hybrid Screen was used to isolate GR interacting proteins. For this purpose, a GR mutant was generated which was transcriptionally inactive but still showed normal repression capacity. With the help of the Two-Hybrid Screen several previously unknown partner proteins which interact with GR in a hormone-dependent manner were identified. One of these called Trip6 was formerly identified as a partner protein of the Thyroid hormone receptor (TR) and the Retinoic acid receptor (RXR), both of which are also able to repress AP-1 activity. In this work Trip6 was functionally characterised.

Trip6 is a mainly nuclear protein, which exists in several different splice forms. The C-terminus of Trip6 contains 3 Lim-domains, which can serve as interaction surfaces for other proteins. Besides the interaction with GR, Trip6 also interacts with the AP-1 component cFos and the NF- κ B subunit RelA. Moreover, Trip6 is a transcriptional repressor, which shows no homology to other known corepressors. Reduction of the endogenous Trip6 protein amount by antisense techniques showed that Trip6 plays a key role in AP-1 repression. In conclusion the following model was developed: a multiprotein complex forms between AP-1, GR and Trip6. Trip6 is thereby able to bring its repressive function into the direct environment of AP-1 and thereby inhibits transcriptional activity. As Trip6 is also able to interact with RelA, Trip6 may be a general factor mediating transcriptional repression by GR.

This work does not only contribute to a more detailed mechanistic understanding of GR dependent AP-1 repression, but also defines a novel class of cofactors of GR.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Abstract.....	4
Abkürzungen.....	9
1 Einleitung.....	13
1.1 Der Glukokortikoidrezeptor vermittelt die Wirkung des Steriodhormons in den Zielzellen.....	14
1.2 Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor.....	15
1.2.1 Der Glukokortikoidrezeptor als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor (Transaktivierung).....	15
1.2.2 Repression von Genen durch den GR (Transrepression).....	18
1.3 Zusätzliche Proteine sind notwendig um AP-1 Repression durch den GR zu vermitteln.....	25
1.4 Mit Hilfe eines Zwei-Hybrid Systems können Interaktionen zwischen zwei Proteinen identifiziert werden.....	26
1.5 Zielsetzung.....	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Material.....	29
2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen.....	29
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	31
2.1.3 Enzyme.....	32
2.1.4 Bakterien und Hefestämme.....	32
2.1.5 Zelllinien und Kulturbedingungen.....	32
2.1.6 Kulturmedien für Hefen und Bakterien.....	33
2.1.6.1 Hefemedien.....	33
2.1.6.2 Medien für <i>E. coli</i> Kulturen.....	34
2.1.7 Plasmide.....	34
2.1.7.1 Expressionsplasmide.....	34
2.1.7.2 Hefepasmide.....	38
2.1.7.3 Plasmide für <i>in vitro</i> Translation.....	39
2.1.7.4 Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen.....	40
2.1.7.5 Plasmide für die Produktion von HIS-Fusionsproteinen.....	40
2.1.7.6 Reporter.....	40

2.1.8 Oligonukleotide	41
2.1.8.1 Zur Verwendung in der PCR:	41
2.1.8.2 Zur Sequenzierung von Trip6:	41
2.1.8.3 Zur Sequenzierung der Genbankplasmide:	41
2.1.9 Antikörper.....	41
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Zellkultur und Transfektionsmethoden.....	43
2.2.1.1 Kulturbedingungen	43
2.2.1.2 Passagieren von Zellen	43
2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
2.2.1.4 Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen.....	43
2.2.1.5 Transfektion mit DEAE-Dextran.....	44
2.2.1.6 Transfektion durch Elektroporation.....	44
2.2.1.7 Herstellen von stabilen Zelllinien.....	44
2.2.2 DNA-Methoden.....	45
2.2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren	45
2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
2.2.2.4 Plasmid DNA Mini-Präparation.....	46
2.2.2.5 Plasmid-DNA Maxi-Präparation	46
2.2.3 Klonierungstechniken.....	47
2.2.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA	47
2.2.3.3 Auffüllen von 5'-Überhängen.....	47
2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
2.2.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	48
2.2.4.1 Chemisch kompetente <i>E. coli</i> Bakterien.....	48
2.2.4.2 Elektrokompente <i>E. coli</i> Bakterien.....	48
2.2.5 Transformation kompetenter Bakterien.....	49
2.2.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien:	49
2.2.5.2 Transformation durch Elektroporation:	49
2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction", PCR)	49
2.2.7 Sequenzierung von DNA.....	50
2.2.7.1 mit ³³ P markierten Didesoxy-NTPs:	50
2.2.7.2 mit dem Vistra DNA Sequenzierer 725.....	50
2.2.8 Protein-Methoden.....	51

2.2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	51
2.2.8.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	51
2.2.8.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE	52
2.2.8.4 Immunoblot-Analyse von Proteinen (“Western-Blot”).....	52
2.2.8.5 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten.....	53
2.2.8.6 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen ...	53
2.2.8.7 Produktion und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	54
2.2.8.8 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen.....	55
2.2.8.9 Immunofluoreszenzfärbung intrazellulärer Proteine	56
2.2.8.10 Immunopräzipitation von <i>in vitro</i> translatiertem Trip6	57
2.2.9 RNA.....	58
2.2.9.1 Präparation von PolyA ⁺ -RNA aus Zellen	58
2.2.9.2 Herstellung von cDNA aus PolyA ⁺ -RNA.....	59
2.2.10 Hefemethoden	59
2.2.10.1 Hefetransformation mit Hilfe von Lithiumazetat.....	59
2.2.10.2 Messung der β -Galaktosidaseaktivität.....	60
2.2.10.3 Gesamtproteinextrakte aus Hefe.....	61
2.2.10.4 Isolieren eines Genbankplasmids	62
2.2.11 Messung der Firefly- und Renillaluziferaseaktivität.....	62
3 Ergebnisse.....	64
3.1 Charakterisierung der verwendeten Glukokortikoidrezeptormutanten hinsichtlich ihrer Transaktivierungs- und Repressionseigenschaften.....	64
3.2 Funktionelle Expression des Glukokortikoidrezeptors in Hefe.....	69
3.3 Die Glukokortikoidrezeptormutante GR _{mH12ΔAF-1} ist eine geeignete Mutante für die Suche nach neuen Partnerproteinen des GR, die an der Repression beteiligt sind	70
3.4 Durchführung eines Two-Hybrid Screens zur Identifikation neuer Partnerproteine des GR, die an der Transrepression beteiligt sind	73
3.4.1 Genbank und Hefetransformation.....	73
3.4.2 Test des zweiten Reporters <i>LacZ</i>	75
3.4.3 Isolierung des Genbankplasmids und Retransformation.....	75
3.5 Interaktion der Two-Hybrid Isolate mit einer GR Mutante, die AP-1 nicht mehr reprimieren kann	80

3.6 Trip6 ist ein Lim-Domänenprotein.....	83
3.7 Die Trip6-cDNA tritt in verschiedenen Spleißformen auf.....	84
3.8 Antisense-Trip6-RNA erhöht das Transaktivierungspotential und erniedrigt das Transrepressionspotential des GR	86
3.9 Herstellung eines Antiserums gegen Trip6.....	89
3.10 Trip6 ist ein nukleäres Protein.....	92
3.11 Trip6 interagiert mit GR <i>in vitro</i>	95
3.12 Trip6 interagiert mit der AP-1 Komponente cFos in einem GST-Fusionsprotein-Interaktionstest	97
3.13 Trip6 interagiert auch mit einer Komponente des Transkriptionsfaktors NF-κB (RelA, p65) in einem GST-Fusionsprotein-Interaktionstest	98
3.14 Trip6 hat transkriptionelle Repressorfunktion.....	99
3.14.1 Der Repressionseffekt ist abhängig von der eingesetzten DNA-Menge und der Anwesenheit von Gal4-Bindestellen im Promotor	102
3.14.2 Trip6 besitzt mindestens zwei unabhängige Repressionsdomänen	104
3.15 Herstellen einer Zelllinie mit reduzierten Trip6 Proteinmengen	109
4 Diskussion.....	112
4.1 GR _{mH12ΔAF-1} ist eine geeignete Mutante für den Einsatz im Two-Hybrid Screen	113
4.2 Neue Interaktionspartner des GR	114
4.3 Trip6 ist ein nukleäres Protein und tritt in verschiedenen Spleißformen auf.....	116
4.4 Trip6 ist ein Kofaktor des GR und ist an der Transaktivierungs- und an der Transrepressionsfunktion beteiligt.....	117
4.5 Führt die Interaktion von Trip6 mit GR und AP-1 (bzw. NF-κB) zur Ausbildung eines ternären Komplexes?	119
4.6 Trip6 hat transkriptionelle Repressorfunktion.....	121
4.7 Modell: Trip6 bringt seine transkriptionelle Repressorfunktion durch Ausbildung eines ternären Komplexes an AP-1	124
4.8 Physiologische Bedeutung.....	125
5 Literatur.....	126

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AF-1, AF-2	Aktivierungsfunktion 1 und 2
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BRG	engl. <i>brahma related gene</i>
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	engl. <i>CREB binding protein</i>
cDNA	copy DNA
CIP	engl. <i>calf intestinal phosphatase</i>
CREB	engl. <i>cAMP responsive element binding protein</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	engl. <i>enhanced chemofluorescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
et al.	und andere (lateinisch et alii)
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
forw	engl. <i>forward</i>
FZK	Forschungszentrum Karlsruhe
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	engl. <i>glucocorticoid responsive element</i>
GRIP	engl. <i>GR interacting protein</i>

GST	Glutathion-S-Transferase
GZL	Gesamtzell-Lysat
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Azetyltransferase
HDAC	Histon-Deazetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HRP	Meerrettich Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LBD	Ligandenbindedomäne
LTR	engl. <i>long terminal repeat</i>
Luc	Luziferase
mH12	Mutante Helix12
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht spezifisch
NF-κB	engl. <i>nuclear factor κB</i>
nGRE	negatives GRE
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PIS	Prä-Immunsrum
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RAR/RXR	Retinsäurerezeptor
rev	engl. <i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRC	engl. <i>steroid receptor coactivator</i>
SWI/SNF	engl. <i>switch/sucrose nonfermentable</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-box bindendes Protein

TBS/T	engl. <i>Tris buffered saline/ Tween</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TIF	engl. <i>transcription intermediary factor</i>
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TR	Thyroidhormonrezeptor
TRE	engl. <i>TPA responsive element</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
w/o	ohne, engl. <i>without</i>
w/v	Masse pro Volumen, engl. <i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T	zum Teil

Appendix

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

1 Einleitung

Glukokortikoide gehörten zu den ersten, um 1930 isolierten Steroidhormonen. Seither lieferte die Untersuchung der Glukokortikoidwirkung viele wichtige Einblicke in die Genregulation durch nukleäre Rezeptoren und andere sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren.

Die Wirkungen der Glukokortikoide im Organismus sind vielfältig. Sie stimulieren die Glukoneogenese, vermindern die Glukoseaufnahme und -verwertung in peripheren Geweben, steigern den Fettabbau, die Freisetzung von freien Fettsäuren und stimulieren die Protein- und Nukleinsäuresynthese in der Leber. Zudem sind sie essentiell für die Aufrechterhaltung einer normalen kardiovaskulären Funktion, für die Absorption und Umverteilung von Calcium sowie bei der Entwicklung und Reifung verschiedener embryonaler Gewebe z.B. der Leber, des Gastrointestinaltrakts und der Lunge (zur Übersicht Felig et al., 1987). Die wichtigste, auch therapeutisch genutzte Wirkung von Glukokortikoiden ist die Unterdrückung von Immun- und Entzündungsreaktionen durch Inhibition der Zytokin- und Chemokinsynthese sowie durch Repression von Genen für Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die bei der Aktivierung, Rekrutierung und Migration von Lymphozyten eine Rolle spielen (zur Übersicht Cato und Wade, 1996; Barnes und Karin, 1997; Barnes, 1998). Da Glukokortikoide in T-Lymphozyten Apoptose auslösen, finden sie auch in der Behandlung von Leukämien und insbesondere von T-Lymphomen ihre Anwendung (zur Übersicht Karin und Saatcioglu, 1997).

Die meisten der immunregulatorischen Gene, die durch Glukokortikoide reprimiert werden, stehen unter der positiven Kontrolle der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß die immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden durch eine Interferenz mit diesen Transkriptionsfaktoren hervorgerufen wird.

Meine Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung von Cortison. Da Cortison seine Wirkung über den Glukokortikoidrezeptor (GR) ausübt (zur Übersicht Yamamoto, 1985; Beato et al., 1995), möchte ich zunächst in die Struktur und Funktion des GR einführen.

1.1 Der Glukokortikoidrezeptor vermittelt die Wirkung des Steroidhormons in den Zielzellen

Nach der passiven Diffusion der lipophilen Steroidhormone durch die Membran der Zielzellen binden Steroide an sogenannte Steroidhormonrezeptoren, die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehören.

Zu diesen ligandenbindenden Transkriptionsfaktoren gehören neben dem GR auch die Rezeptoren für Mineralokortikoide, Androgene, Östrogene, der Vitamin D₃-, Thyroidhormon- und der Retinsäurerezeptor (zur Übersicht Evans, 1988; Green und Chambon, 1988; Beato, 1989). Zudem enthält die Klasse der nukleären Rezeptoren noch weitere Mitglieder, deren physiologischen Liganden bisher noch nicht identifiziert wurden (sog. *Orphan-Receptors*; Mangelsdorf et al., 1995).

Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie zeigen eine charakteristische Domänenstruktur, die anhand des GR verdeutlicht werden soll.

Eine schematische Darstellung der Domänen des GR findet sich in Abb.1(zur Übersicht Evans, 1988; Beato, 1989, Cato et al., 1992, Tsai und O'Malley, 1994, Beato et al., 1995). Die zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) ist innerhalb der Familie der Steroidrezeptoren stark konserviert. Sie besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, wobei je ein Zinkatom durch vier Cysteinreste koordinativ gebunden wird (Freedman et al., 1988). Die Aminosäuren des ersten Zinkfingers sind für die sequenzspezifische Bindung des Rezeptors an die DNA verantwortlich, während der zweite Zinkfinger für die Dimerisierung von GR-Molekülen wichtig ist (D-Loop; Umesono und Evans, 1989; Härd et al., 1990, Dahlman-Wright et al., 1991; Glass, 1994; Zilliacus et al., 1995). Die DBD ist mit der Liganden-Bindedomäne (LBD) durch eine "hinge"-Region verbunden. In diesem Bereich liegen Sequenzen, die an der Translokation des Rezeptors in den Zellkern beteiligt sind (nuclear localization signal, NLS; Picard und Yamamoto, 1987). Die C-terminale Liganden-Bindedomäne (LBD) ist neben der Bindung des Liganden (Carlstedt-Duke et al., 1988) auch an der Transaktivierung beteiligt. Es wurde eine Transaktivierungsdomäne $\tau 2$ direkt am Anschluß an die DBD beschrieben (Hollenberg und Evans, 1988) sowie eine weitere Transaktivierungsfunktion AF-2 (Aminosäuren 727 bis 763), die im Gegensatz zur aminoterminalen AF-1 (oder $\tau 1$) von der Ligandenbindung abhängig ist (Danielian et al., 1992).

Die Ligandenbindedomänen aller nukleären Rezeptoren zeigen eine ähnliche Tertiärstruktur, wie Kristallstrukturanalysen von Retinsäurerezeptoren (RAR und RXR), des Progesteron-rezeptors und des Östrogenrezeptors ergeben haben (Darimont et al., 1998; Shian et al., 1998; Williams et al., 1998). Die LBD ist aus 12 amphipatischen α -Helices und einer β -Faltblattstruktur aufgebaut, die gemeinsam eine Ligandenbindetasche formen. Nach Ligandenbindung kommt es zu intramolekularen Umlagerungen der Helices 10, 11 und 12, wodurch die Ligandenbindetasche abgeschlossen wird. Durch das Zurückklappen der Helix 12 auf die Helix 3 entstehen neue Proteinoberflächen, die für die Interaktion mit Koaktivatoren wie z.B. SRC-1 (engl. *steriod receptor coactivator 1*) und TIF2 (engl. *transcription intermediary factor 2*) notwendig sind (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995; zur Übersicht Moras und Gronemeyer, 1998).

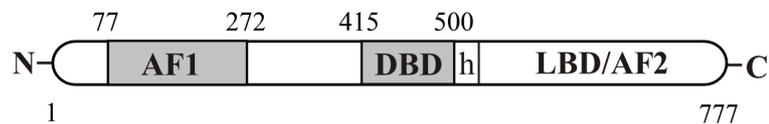


Abb.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel des menschlichen Glukokortikoidrezeptors

Die Zuordnung der Rezeptorfunktionen zu den einzelnen Domänen ist im Text beschrieben. Die Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen. N, Amino-Terminus; C, Carboxy-Terminus; AF-1 und 2, Aktivierungsfunktion 1 und 2; DBD, DNA-Bindedomäne; h, hinge-Region; LBD, Ligandenbindedomäne.

1.2 Regulation der Genexpression durch den Glukokortikoidrezeptor

In Abwesenheit von Glukokortikoiden liegt der Rezeptor in einer inaktiven Form als Komplex mit verschiedenen Hitzeschockproteinen (u.a. Hsp90 und Hsp70) im Zytoplasma vor (Pratt, 1993; Dittmar et al., 1997; zur Übersicht Buchner, 1999). Ligandenbindung führt zur Dissoziation des Multi-Proteinkomplexes und zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern. Neuere Ergebnisse zeigen, daß die Hitzeschockproteine ebenfalls in den Zellkern rekrutiert werden können oder nukleäre Isoformen besitzen (DeFranco et al., 1998; Kang et al., 1999). Hsp90 und Hsp70 kolokalisieren mit nukleären Rezeptoren im Kern und bilden auch in diesem zellulären

Kompartiment Proteinkomplexe mit den Steroidhormonrezeptoren aus. Welche Funktion die Hitzeschockproteine im Kern ausüben ist bisher noch unbekannt.

Der ligandengebundene GR kann die Expression von Zielgenen in verschiedener Weise modulieren. Zum einen kann er als Homodimer an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen der Zielgene binden und deren Transkription aktivieren (Transaktivierung). Des Weiteren ist der Glukokortikoidrezeptor auch in der Lage die Expression bestimmter Zielgene zu reprimieren (Transrepression).

1.2.1 Der Glukokortikoidrezeptor als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor (Transaktivierung)

Für die Transaktivierung von positiv hormonregulierten Zielgenen muß der GR als Homodimer direkt an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen dieser Gene binden. Es handelt sich hierbei um eine palindromische DNA-Sequenz (Konsensus: AGAACANNNTGTTCT) die als Glukokortikoid-responsives-Element (engl. *glucocorticoid responsive element*, GRE) bezeichnet wird (zur Übersicht Yamamoto, 1985; Beato et al., 1995). Beispiele solcher positiv hormonregulierten Zielgene sind das Gen für die an der Glukoneogenese beteiligte Tyrosinaminotransferase (Jantzen et al., 1987) und das menschlich Metallothionein IIA-Gen (Karin et al., 1984). Auch der *long terminal repeat (LTR)*-Promotor des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) (Ponta et al., 1985) enthält mehrere GREs und wird im experimentellen Zellsystem häufig als GR-induzierbarer Promotor in Reportergenen verwendet.

In der DNA-gebundenen Form kann der Rezeptor direkt mit dem basalen Transkriptionsfaktor TFIIB, dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) und TAFII30, zwei Komponenten des basalen Transkriptionsfaktors TFIID, interagieren (Ing et al., 1992; Baniahmad et al., 1993; Jacq et al., 1994; Sadovsky et al., 1995; zur Übersicht Horwitz et al., 1996). Diese tragen aber nur einen Teil zur transkriptionellen Aktivität des Rezeptors bei. Wichtiger für die transaktivierende Funktion der nukleären Rezeptoren ist die Interaktion mit Koaktivatoren.

Koaktivatoren sind definitionsgemäß Faktoren, die nicht bei der basalen Transkription beteiligt sind. Sie selbst können keine Transkription induzieren, da sie keine DNA-Bindedomäne besitzen, worüber sie an Promotorregionen binden könnten. Koaktivatoren lassen sich in zwei generelle

Klassen einteilen: die Mitglieder der SWI/SNF-Proteinfamilie (engl. *switch/sucrose nonfermentable*) und Mitglieder der Histon-Azetyltransferase-Familie. Beide Klassen sind in der Lage die Chromatinstruktur zu verändern und dadurch Transkription zu erleichtern. Teilweise können sie auch direkt die Aktivität der basalen Transkriptionsmaschinerie oder die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen (zur Übersicht Collingwood et al., 1999, Glass und Rosenfeld, 2000).

Der in Hefe identifizierte SWI/SNF-Komplex (Neigeborn und Carlson, 1984; Stern et al., 1984), der auch in *Drosophila* (Papoulas et al., 1998) und Säugern als Multiproteinkomplex vorhanden ist (Muchardt und Yaniv, 1993; Chiba et al., 1994), bewirkt eine ATP-abhängige Repositionierung der Nukleosomen, was zu einer lokalen Veränderung der Chromatinstruktur führt. Durch die Interaktion des GR mit BRG1, einer Komponente des humanen SWI/SNF-Komplexes, wird die Chromatinstruktur in der Umgebung des GRE verändert und weitere sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren oder Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie haben einen erleichterten Zutritt zu der Promotorregion (Fryer und Archer, 1998). Der Prä-Initiationskomplex kann sich leichter und stabiler ausbilden und die Transkription des Zielgens wird verstärkt (zur Übersicht Zawel und Reinberg, 1993; Orphanides et al., 1996; Wilson et al., 1996).

Die zweite Gruppe der Koaktivatoren enthält intrinsische Histon-Azetyltransferaseaktivität und verändert dadurch den Azetylierungsstatus des Chromatins (zur Übersicht Wade und Wolffe, 1997; Torchia et al. 1998).

Nicht-azetylierte Histone bewirken eine dichtere Chromatinpackung, was eine schlechtere Bindung verschiedenster Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen zur Folge hat. Durch die Azetylierung der Histone wird die Chromatinstruktur aufgelockert und Transkriptionsfaktoren können leichter an Promotorregionen binden, was in einer verstärkten Transkriptionsaktivität in dem betreffenden Bereich resultiert (zur Übersicht Berger, 1999). Der Azetylierungsstatus wird durch zwei Enzymaktivitäten, den Histon-Azetyltransferasen (HAT) und den Histon-Deazetylasen (HDAC) aufrecht erhalten (zur Übersicht Wade und Wolffe, 1997; Xu et al., 1999).

Beispiele für Koaktivatoren mit HAT-Aktivität sind CBP/p300 (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996), SRC-1 (Onate et al., 1995) und TIF-2/GRIP-1 (Voegel et al., 1996; Hong et al., 1996).

CPB wurde als interagierendes Protein des Transkriptionsfaktors CREB isoliert, während p300 als das Schlüsselprotein für die Wirkungsweise des Onkoproteins E1A des Adenovirus identifiziert wurde (Whyte et al., 1989; Chrivia et al., 1993; Eckner et al., 1994). Beide Proteine sind sehr eng miteinander verwandt und üben größtenteils dieselben zellulären Funktionen aus (Arany et al., 1994; zur Übersicht Shikama et al., 1997). CBP und p300 dienen für eine Reihe sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren als Koaktivatoren (Kamei et al., 1996; Chakravarti et al., 1996; zur Übersicht Shikama et al., 1997; McKenna et al., 1999). Durch eine direkte Interaktion mit der RNA Helikase A, die wiederum an die RNA Polymerase II bindet, vermittelt CBP/p300 die Transkriptionsaktivierung (Nakajima et al., 1997). Durch die zusätzlich enthaltene HAT-Aktivität der beiden Proteine wird die Chromatinstruktur aufgelockert und die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes wird erleichtert bzw. stabilisiert.

SRC-1 und TIF-2 interagieren über ein LXXLL-Sequenzmotiv (Heery et al., 1997) mit der Transaktivierungsfunktion AF-2 im C-Terminus. SRC-1 kann zusätzlich mit CBP interagieren, wodurch beide Faktoren synergistisch wirken (Smith et al., 1996).

GRIP-1 wurde mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens als GR interagierendes Protein identifiziert (Hong et al., 1996). Es interagiert mit der Hormonbindedomäne des GR und bildet zusätzlich zu seiner HAT Aktivität einen direkten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie aus (Walfish et al., 1997; Hong et al., 1997).

1.2.2 Repression von Genen durch den GR (Transrepression)

Die anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden wird der Repression von Genen zugeschrieben, die eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen spielen (zur Übersicht Barnes und Adcock, 1993; Cato und Wade, 1996; Barnes und Karin, 1997; Barnes, 1998). Hierzu zählen Gene, die für Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und bei entzündlichen Prozessen beteiligten Enzyme kodieren.

Viele der "pro-inflammatorischen" Gene unterliegen der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B und werden durch Cortison reprimiert. Das heißt, daß die Hemmung der Aktivität von AP-1 und NF- κ B durch den GR die molekulare Grundlage der anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung der Glukokortikoide bilden könnte.

Der zugrundeliegende Repressionsmechanismus ist für die einzelnen, durch GR reprimierten Gene sehr unterschiedlich. Die Expression vieler Gene wird durch eine Interferenz des GR mit den an der positiven Regulation des Zielgens beteiligten Transkriptionsfaktoren reprimiert.

Zusätzlich zur Repression direkt am Promotor des betreffenden Gens, kann der GR auch durch Synthese von inhibitorischen Proteinen oder durch Hemmung von Signaltransduktionskaskaden die Expression bestimmter Gene unterbinden. Die verschiedenen Repressionsmechanismen sollen nun anhand von Beispielen näher erläutert werden.

a) Repression durch Synthese eines Inhibitors

Die Synthese eines inhibitorischen Proteins ist ein mögliches Modell zur Erklärung der NF- κ B Repression durch den GR.

Die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf verschiedenen DNA-bindenden Proteinen, die alle eine N-terminale RelA-Homologiedomäne enthalten (RelB, cRel, p65 (RelA), p105 und p100 (Vorläufer von p50 und p52)). Diese Domäne dient zur DNA-Bindung, Dimerisierung, nukleären Lokalisation und zur Interaktion mit anderen Proteinen, einschließlich der inhibitorischen I κ B Proteine (zur Übersicht Dumont et al, 1998). In den meisten Zelltypen hält das I κ B Protein NF- κ B (oft ein Heterodimer aus p50 und RelA) durch Maskierung der nukleären Lokalisations-Sequenzen der einzelnen Untereinheiten im Zytoplasma zurück. Stimulation der Zellen mit einer Vielzahl von Signalen z.B. Zytokinen, UV- Bestrahlung, Oxidantien etc. führt zu einer Aktivierung von NF- κ B. Diese Aktivierung wird hauptsächlich durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung von I κ B vermittelt, wodurch I κ B durch das Proteasom degradiert wird. Das freigesetzte NF- κ B Dimer kann in den Zellkern translozieren, an spezifische DNA-Sequenzen binden und die Transkription seiner Zielgene induzieren.

Viele der immunologisch relevanten Zielgene des NF- κ B Transkriptionsfaktors (Zytokine, Oberflächenrezeptoren etc.) werden durch Glukokortikoide reprimiert. Als Ursache dieser

Repression werden in der Literatur zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Das erste Modell führt die Repression auf eine Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Transkriptionsfaktoren zurück. Dieses Modell wird im Abschnitt d) detailliert beschrieben. Das zweite Modell, das sog. I κ B-Modell, geht davon aus, daß die Repression der NF- κ B Aktivität durch eine verstärkte Synthese des I κ B-Proteins nach Cortisongabe vermittelt wird (Scheinmann et al., 1995; Auphan et al., 1995). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, daß in vielen Zelltypen die NF- κ B Repression durch den GR von der I κ B-Induktion entkoppelt werden kann (Brostjan et al., 1996; Palvimo et al., 1996; De Bosscher et al., 1997; Heck et al., 1997; Wissink et al., 1997). Eine dimerisierungsdefekte GR-Mutante (transkriptionell inaktiv) zeigte keine Induktion von I κ B, war aber dennoch in der Lage die NF- κ B Aktivität effizient zu reprimieren (Heck et al., 1997). Die Induktion des I κ B Proteins stellt somit nicht den generellen Mechanismus der NF- κ B Repression dar.

b) Repression durch Hemmung von Signaltransduktionskaskaden

Der GR ist auch in der Lage mit dem Transaktivierungspotential des Transkriptionsfaktors AP-1 zu interferieren. Ein publiziertes Modell der AP-1 Repression beruht auf der Hemmung der Jun-Kinaseaktivität (JNK) durch den GR (Caelles et al., 1997).

AP-1 (Aktivatorprotein 1) ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der aus Homodimeren der Jun-Familie (cJun, JunB und JunD) oder Heterodimeren der Jun- und Fosfamilie (cFos, FosB, Fra1 und Fra2) besteht (zur Übersicht Angel und Karin, 1991). Unter ihnen ist cJun der Hauptbestandteil aller AP-1 Komplexe und cFos sein am besten bekannter Partner (Bohmann et al., 1987; Angel et al., 1988). AP-1 wird durch Mitogene, Onkoproteine, Zytokine und UV-Strahlung aktiviert. Die Aktivierung von AP-1 wird durch post-translationelle Modifikationen und gesteigerte Synthese der AP-1 Komponenten vermittelt (zur Übersicht Angel und Karin, 1991; Karin, 1995; Karin et al; 1997). Die transkriptionelle Aktivität von cJun wird durch die aminoterminal Phosphorylierung an den Serinresten 63 und 73 gesteigert (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991). Diese induzierbare Phosphorylierung wird durch die Mitglieder der Jinkinase-Familie (JNK, *cjun amino-terminal kinase*; Hibi et al., 1993; Derijard et al., 1994)

vermittelt und ist notwendig für die Rekrutierung des Koaktivators CBP (Arias et al., 1994; Bannister et al., 1995).

Der hormonbeladene GR ist in der Lage die Aktivierung der JNK zu hemmen und verhindert dadurch die Aktivierung von cJun. Der beobachtete Repressionseffekt auf die JNK ist unabhängig von der transkriptionellen Aktivität des Hormonrezeptors (Caelles et al., 1997). Der genaue Mechanismus und auf welcher Ebene der Signalkaskade der GR hemmend eingreift, ist bisher noch ungeklärt.

Um die beschriebene Hemmung der JNK zu erhalten, müssen sehr hohe Hormonkonzentrationen eingesetzt werden (10^{-6} M). AP-1 Repression durch den GR kann jedoch bereits bei Hormonkonzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-9} M Dexamethason gemessen werden (Jonat et al., 1990). Die Hemmung der JNK-Aktivität spielt demnach eher bei hohen Dexamethasonkonzentrationen eine Rolle und kann die bereits bei viel geringeren Konzentrationen erfolgende AP-1 Repression nicht erklären.

c) Repression über GR-Bindestellen in den Promotoren der Zielgene

Eine Möglichkeit der Repression von Genen über GR-Bindestellen liegt in der Konkurrenz um überlappende Bindestellen. Am Beispiel des Prolactin-Gens soll dieser Mechanismus kurz erläutert werden. Das Prolactin-Gen wird in der Hypophyse exprimiert und ist am negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen adrenalen Glukokortikoiden und Adrenokortikotropin der Hypophyse beteiligt. Die Repression dieses Promotors wird durch Konkurrenz des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren um die Bindung an die DNA vermittelt (Sakai et al., 1988). Der Promotor enthält eine GR-Bindestelle, die sich von klassischen GREs insofern unterscheidet, daß nach Bindung des GR keine Aktivierung der Transkription erfolgt. Diese Elemente werden auch als negative GRE (nGRE) bezeichnet und zeigen keine Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz eines klassischen GREs. Überlappend zu diesem nGRE liegen im Prolactin-Promotor Bindestellen für den Hypophysen-spezifischen Transkriptionsfaktor Pit-1/GHF-1 und den ubiquitären Faktor XTF (Subramaniam et al., 1997), die gemeinsam für die Expression des Gens verantwortlich sind. In Anwesenheit von Glukokortikoiden werden diese Faktoren durch den ligandengebundenen GR verdrängt.

Nach einem ähnlichen Mechanismus erfolgt die Repression des humanen knochenspezifischen Osteocalcin-Gens. Hier überlappt die Bindestelle des basalen Transkriptionsfaktors TFIID mit einem nGRE (Celeste et al., 1986; Strömstedt et al., 1991; Meyer et al., 1997). Dadurch verhindert der hormonbeladene GR die Bildung des Transkriptions-Initiations-Komplexes.

Ein weiteres Beispiel eines GR reprimierten Gens, das murine Proliferin, zeigt einen etwas unterschiedlichen Mechanismus. Der Proliferinpromotor enthält keine überlappenden Bindestellen, sondern Bindestellen für den Glukokortikoidrezeptor und für AP-1 in direkter Nachbarschaft. Dieses regulatorische Promotorelement wird deshalb als zusammengesetztes GRE bezeichnet (engl. *composite* GRE).

Der Glukokortikoidrezeptor bindet an den Promotor, kann aber nur in Anwesenheit von AP-1 die Transkription regulieren. Besteht AP-1 aus einem Heterodimer von cJun und cFos wird die Transkription des Proliferingens reprimiert. Ist AP-1 jedoch aus cJun-Homodimeren zusammengesetzt, erfolgt eine Aktivierung der Transkription (Diamond et al., 1990; Pearce und Yamamoto, 1993).

d) Repression durch Modulation der Transaktivierungsfunktion anderer Transkriptionsfaktoren (ohne DNA-Bindung des GR)

Die meisten der immunregulatorischen Gene, die durch Glukokortikoide reprimiert werden, stehen unter der positiven Kontrolle der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B und enthalten keine Bindestellen für den GR in ihren Promotoren. Die Repression wird bei diesen Genen vermutlich durch eine Protein-Interaktion zwischen dem GR und dem positiv regulierenden Transkriptionsfaktor vermittelt.

Eines der am besten untersuchten Beispiele für diese Form der AP-1 Repression durch den GR ist das menschliche Kollagenase I-Gen (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Kollagenase I ist eine Metalloprotease und ist maßgeblich an der Gewebeerstörung infolge rheumatoider Arthritis beteiligt. Ihre Expression wird durch den Transkriptionsfaktor AP-1 positiv reguliert. Die Aktivierung von AP-1 erfolgt durch eine Reihe physiologischer (Wachstumsfaktoren, Protoonkogene) und unphysiologischer Agenzien (UV-Strahlung, Tumorpromotoren wie der Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat,

TPA) (Angel und Karin, 1991; Radler-Pohl et al., 1993). Aktiviertes AP-1 induziert die Transkription des Kollagenase I-Gens durch die direkte Bindung an sogenannte „auf TPA reagierende Elemente" (TRE) in der Promotorregion (Angel et al., 1987a und 1987b; Lee et al., 1987).

Der Kollagenase I-Promotor enthält keine Bindestelle für den GR und die beobachtete Repression beruht nicht auf einer Verdrängung des AP-1 Proteins von der DNA (Jonat et al., 1990; König et al., 1992).

Umgekehrt kann auch aktiviertes AP-1 den GRE gebundenen GR hemmen (Schüle et al., 1990; Lucibello et al., 1990). Dimerisierungsdefekte Mutanten des GR zeigten, daß AP-1 Repression eine Funktion des monomeren GR ist und somit keine DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität des Rezeptors benötigt (Heck et al., 1994). Obwohl der GR nicht an DNA bindet, ist die DBD des Rezeptors sowie Bereiche des N-Terminus und C-Terminus des GR notwendig für die AP-1 Repression (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Kerppola et al., 1993).

Alle diese Befunde lassen auf eine Protein-Protein-Interaktion des GR mit AP-1 schließen, die in einem inaktiven DNA-gebundenen Komplex resultiert. *In vitro* konnte tatsächlich eine physikalische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Touray et al., 1991).

Neben der AP-1 Repression wird auch für NF- κ B ein Repressionsmechanismus diskutiert, der eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem GR und der p65 Untereinheit von NF- κ B beinhaltet (zur Übersicht McKay und Cidlowski, 1999). Die Interaktion wird durch die DNA-Bindedomäne des GR und der Rel-Homologiedomäne in p65 vermittelt (Caldenhoven et al., 1995; Ray und Prefontaine, 1994; Schreinman et al., 1995; zur Übersicht McKay und Cidlowski, 1998). Die Repression ist wechselseitig, d.h. NF- κ B kann auch mit der transkriptionellen Aktivität des GR interferieren und die DNA-Bindungskapazität von NF- κ B wird nicht beeinflusst (Ray und Prefontaine, 1994; Van den Stolpe et al., 1994; Schreinman et al., 1995; Brostjan et al., 1996). Der genaue Mechanismus der NF- κ B Repression durch Protein-Protein-Wechselwirkung ist noch nicht bekannt.

Trotz jahrelanger intensiver Untersuchungen sind viele Aspekte der Transrepression durch den GR weiterhin ungeklärt.

Ein umstrittenes Modell zur Erklärung der AP-1 Repression wurde von Kamei et al. (1996) publiziert. Hiernach soll die Repression durch Konkurrenz um den gemeinsamen Koaktivator CBP/p300 (engl. *CREB binding protein*), der in der Zelle nur in limitierenden Mengen vorhanden ist, vermittelt werden. Durch die Bindung von CBP an GR wird die verfügbare Menge an freiem Koaktivator vermindert (engl. *sqelching*) und AP-1 somit in seiner transkriptionellen Aktivität gehemmt.

Dieses Modell wurde auch für Repression von NF- κ B vorgeschlagen (Zong et al., 1998; Sheppard et al., 1998; Lee et al., 1998). Viele Argumente sprechen gegen dieses Modell:

NF- κ B Zielgene werden unabhängig von der Menge des Koaktivators CBP durch GR reprimiert (De Bosscher et al., 2000). Zusätzlich wird der Repressionseffekt durch die Überexpression der p65 Untereinheit nicht verstärkt, sondern aufgehoben (Caldenhoven et al., 1995), obwohl CBP auch ein Koaktivator für NF- κ B ist.

Wäre CBP tatsächlich limitierend, so sollte jede Aktivierung des GR zu einer Hemmung aller Transkriptionsfaktoren führen, die ebenfalls CBP als Koaktivator benötigen (z.B. alle anderen Steroidhormonrezeptoren). Dies ist jedoch nicht der Fall. Repression durch den GR ist hauptsächlich auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B beschränkt, in einigen Zelltypen werden auch die Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 (Kutoh et al., 1992; Prefontaine et al., 1998; Wieland et al., 1998; Subramaniam et al., 1998) und GATA (Burcin et al., 1994) durch den GR reprimiert.

Durch geeignete Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne des GR konnten Mutanten hergestellt werden, die normale Transaktivierung aber keine AP-1 Repression zeigten (S425G, L436V, Heck et al., 1994). Diese dissoziierenden GR-Mutanten sind vermutlich in der Lage CBP zu binden (zu schließen aus dem normalen bis leicht gesteigerten Transaktivierungspotential), zeigen aber dennoch keine AP-1 Repression.

1.3 Zusätzliche Proteine sind notwendig um AP-1 Repression durch den GR zu vermitteln

Unklar ist, wie durch die Protein-Protein-Wechselwirkung des GR mit AP-1 und NF- κ B ein transkriptionell inaktiver Komplex gebildet wird. Durch welchen Mechanismus werden die Transaktivierungsdomänen von AP-1 und NF- κ B und die zwei Transaktivierungsdomänen des hormonbeladenen GR „inaktiviert“?

Eine mögliche Erklärung ist, daß durch die Proteininteraktion des GR mit AP-1 und NF- κ B wichtige Proteinoberflächen maskiert werden, die für die Koaktivatorbindung essentiell sind. Ein Beweis für diese Hypothese wurde bisher nicht erbracht.

Ist eine direkte Interaktion des GR mit AP-1 bzw. NF- κ B ausreichend um Repression zu vermitteln, oder sind an diesem Prozeß noch zusätzliche Faktoren beteiligt?

AP-1 Repression zeigt eine Zelltypspezifität (Shemshedini et al., 1991). Dies deutet darauf hin, daß an der AP-1 Repression zusätzliche, zelltypspezifische Faktoren beteiligt sind.

Einen weiteren Hinweis für die Existenz zusätzlicher Faktoren liefern Interaktionsstudien zwischen AP-1 und einer bestimmten GR-Mutante. Die hierzu verwendete GR-Mutante GR_{mDBD} trägt zwei Punktmutationen in der DBD (C476W und R479Q) und zeigt *in vitro* keine Transaktivierung und keine Transrepression. In einem *in vitro* Interaktionstest konnte diese Mutante aber immer noch an AP-1 binden (Göttlicher et al., 1996), was zu der Hypothese führte, daß die Bindung des GR an AP-1 alleine nicht ausreichend ist, um Repression zu vermitteln.

AP-1 läßt sich in Hefe als Heterodimer aus cJun und cFos rekonstituieren und zeigt eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität. Durch die Koexpression des in Hefe funktionellen GR läßt sich die AP-1 Aktivität nicht hemmen (eigene Vorarbeiten, Daten nicht gezeigt). AP-1 Repression läßt sich somit in Hefe nicht rekonstituieren.

Zusammengenommen sprechen alle diese Befunde für die Existenz zusätzlicher Faktoren, die AP-1 Repression durch den GR vermitteln.

1.4 Mit Hilfe eines Zwei-Hybrid Systems können Interaktionen zwischen zwei Proteinen identifiziert werden

Um nach den bei der Transrepression durch den GR beteiligten Faktoren zu suchen, kann das Zwei-Hybrid System in der Hefe benutzt werden (engl. *Two-Hybrid Screen*). Es ist eine häufig angewandte Methode, um Interaktionspartner eines gewünschten Proteins zu identifizieren.

Die konzeptionelle Grundlage des Two-Hybrid Systems geht auf Untersuchungen des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 zurück. Gal4 besteht aus zwei klar trennbaren Domänen; einer sequenzspezifischen DNA-Bindedomäne (DBD) im N-Terminus und einer Transaktivierungsdomäne (TAD) im C-Terminus des Proteins (Hope und Struhl, 1986; Keegan et al., 1986; Fields und Song, 1989). Getrennt voneinander sind die beiden Domänen nicht in der Lage die Transkription eines Reportergens zu aktivieren.

Basierend auf diesen Erkenntnissen können chimäre Fusionsproteine zweier Proteine X und Y mit der Gal-DBD bzw. mit der Gal-TAD hergestellt werden (Abb.2). Interagieren die Proteine X und Y miteinander, so werden die getrennten Gal4-Domänen wieder zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor rekonstituiert, und sind in der Lage ein geeignetes Reportergen zu aktivieren. Der Hefestamm Y190 enthält zwei integrierte Gal4-abhängige Reportergene, die unterschiedliche Promotorkontexte besitzen. Somit kann neben der Blaufärbung (Aktivierung des β -Galaktosidase-Reportergens) noch zusätzlich auf Histidinprototrophie (durch Expression des HIS3-Reportergens) in Folge einer Protein-Protein-Interaktion selektioniert werden.

Sollen neue Interaktionspartner identifiziert werden, wird anstelle des Proteins Y eine Genbank verwendet, deren cDNA-Fragmente an die Gal4-TAD fusioniert wurden. Nach Transformation der Genbank in einen Hefestamm, der das DBD-Zielprotein enthält, sollten nur Transformanten mit potentiell interagierenden Proteinen auf Histidin-defizienten Selektionsplatten Kolonien bilden, die dann auf die Aktivität des zweiten unabhängigen Reporters β -Galaktosidase überprüft werden. Die cDNA-Fragmente der positiven Klone werden anschließend isoliert und sequenziert (Zur Übersicht Fields und Sternglanz, 1994; Allen et al., 1995).

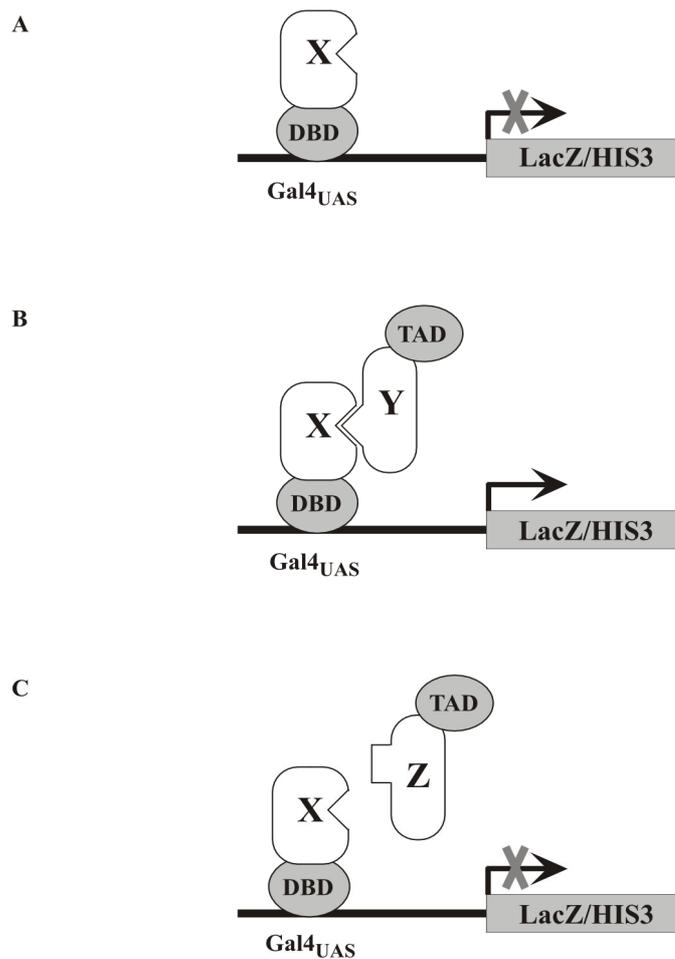


Abb.2: Schematische Darstellung des Zwei-Hybrid Systems.

A) Das Zielprotein X, fusioniert an die Gal4_{DBD} wird in einem Hefestamm exprimiert, der die beiden Reportergene LacZ und HIS3 unter der Kontrolle des Gal4-Promotors trägt. Die Reportergene sind an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert. Da das Hybridprotein kein Transaktivierungspotential besitzt, werden die Reportergene nicht transkribiert. **B)** Ein zweites Hybridprotein Y, fusioniert an die Gal_{TAD} wird in den Hefestamm eingebracht. Im Falle einer Interaktion der Proteine X und Y, wird die Transaktivierungsfunktion des Gal4-Proteins rekonstituiert, was zur Aktivierung der Reportergene führt. **C)** Interagieren die Proteine X und Z nicht miteinander bleibt die Aktivierung der Reportergene aus.

DBD: DNA-Bindedomäne; TAD; Transaktivierungsdomäne; Gal4_{UAS}: Bindestellen für Gal4 (engl. upstream activating sequences); LacZ: β -Galaktosidase; HIS3: Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Histidin.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es Kofaktoren zu identifizieren, die an der Repression von AP-1 durch den GR beteiligt sind.

Hierzu wurden folgende Teilziele angestrebt:

1. Herstellen einer geeigneten GR-Mutante für einen Two-Hybrid Screen

Zusätzliche Faktoren, die an der AP-1 Repression beteiligt sind, sollten als interagierende Proteine des GR mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens identifiziert werden. Voraussetzung für die Durchführung eines Two-Hybrid Screens ist, daß das Zielprotein selbst keine transaktivierenden Eigenschaften besitzt. Aus diesem Grund sollte eine GR-Mutante hergestellt werden, die in Hefe keine Transaktivierung zeigt.

Da mit dieser Mutante Partnerproteine für die AP-1 Repression gesucht werden sollten, mußte die Mutante noch in der Lage sein, in höheren Zellen AP-1 zu reprimieren.

2. Durchführung eines Two-Hybrid Screens zur Identifizierung neuer Partnerproteine des GR

Mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen HeLa-cDNA-Bibliothek sollten bisher unbekannte Partnerproteine der hormonbeladenen GR-Mutante identifiziert werden.

3. Auswahlkriterien für Proteine, die auf eine potentielle Beteiligung am Repressionsprozeß untersucht werden und Überprüfung ihrer Funktionen in höheren Zellen

AP-1 Repression ist ein hormonabhängiger Prozeß. Aus diesem Grund sollten nur die hormonabhängig interagierenden Proteine weiterverfolgt werden. Mit Hilfe einer weiteren GR-Mutante GR_{mDBD}, die in Säugetierzellen keine Transrepression zeigt, sollten Proteine eliminiert werden, die beim Repressionsprozeß vermutlich keine Rolle spielen. Alle hormonabhängigen Isolate sollten auf eine potentielle Interaktion mit der Mutante getestet werden. Nur die Isolate, die keine Interaktion mit dem GR_{mDBD} zeigen sollten anschließend in Säugetierzellen auf ihre Rolle beim AP-1 Prozeß genauer untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

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

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Adenin	Merk, Darmstadt
Agarose	Biozym Diagnostik, Hameln
Aminosäuren	Merk, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin	Roche Diagnostics, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coelenterazin	Biosynth AG, Staad (Schweiz)
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco BRL, Eggenstein
DMSO	Fluka, Buchs
ECL™ <i>Western blotting detection reagents</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker, Verviers
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Genitacin-Sulfat (G418)	Gibco BRL, Eggenstein

Glasperlen	Sigma, Deisenhofen
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glycylglycin	Sigma, Deisenhofen
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Heringssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
Lithium Azetat	Sigma, Deisenhofen
Luziferin	Biosynth AG, Staad (Schweiz)
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Molekulargewichts-Standard für	
SDS Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Nutrient-Broth	Difco BRL, Eggenstein
N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin	BioRad, München
N,N'-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40	Fluka, Buchs
Oligo-dT-Zellulose	Roche Diagnostics, Mannheim
ONPG	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglycol 4000	Sigma, Deisenhofen
Protein A-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Quiagen-tip-500	Diagen, Düsseldorf
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
TPA	Sigma, Deisenhofen
Triamcinolon Acetonid	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	BioRad, München

tRNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Difco, Detroit
Tween20	Serva, Heidelberg
Uracil	Merk, Darmstadt
Vitamin B1	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Yeast Nitrogenbase w/o aminoacids	Difco, Detroit

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Hereus, Stuttgart
ECL-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München Hoefer Scientific Instr., USA
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Hyperfilm XR®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckmann, Stuttgart
Luminometer	Berthold, Wildbad
Perkin Elmer Cetus 9600 Thermocycler	Perkin Elmer Cetus, Norwalk
Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membran (Immobilon)	Millipore, Bedford
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiscan PLUS MKII Elisa-Reader	Labsystems, Finnland
Transilluminator (IL-350M)	Bachhofer, Reutlingen
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Vakuum-Konzentrator ("speed vac")	Savant, Farmingdale
3MM Whatman Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen

2.1.3 Enzyme

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

2.1.4 Bakterien und Hefestämme

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

Genotyp: *F⁻; ompT; hsdSB; (rB-,mB-); dcm; gal; (DE3); pLysS (Cmr)*

E. coli XL-1 blue: Bakterienstamm für Klonierungen

Genotyp: *F[']::Tn10proA+b+lacIq, d(lacZ)M15, recA1, endA1, gyrA96, (Nal^r), thi, hsdR17 (rK-,mK+), supE44, relA1, lac*

KC8: Bakterienstamm für die Isolierung von Genbankplasmiden aus Hefe

Genotyp: *hsdR; leuB600; trpC9830; pyrF::Tn5; hisB463; lacDX74; strA; galU,K*

Y187: Hefestamm für die Retransformation isolierter Genbankplasmide;

Genotyp: *MATa; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3,112; gal4D; met-; gal80D;*

URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ

Y187CU: Hefestamm für die Transformation des GRE-Reportergens;

Genotyp: *MATa; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3,112; gal4D; met-; gal80D*

Y190: Hefestamm verwendet für den Two-Hybrid Screen

Genotyp: *MATa; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3,112; gal4D; gal80D; cyhr2;*

LYS2:: GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3 ; URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ

2.1.5 Zelllinien und Kulturbedingungen

Cos7:

Affen-Nierenzelllinie; Glukokortikoidrezeptor defizient; Cos7-Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert.

HeLa tk-:

Menschliche Zervixkarzinom-Zelllinie; Subklon der parentalen HeLa-Linie ohne Thymidinkinaseaktivität. HeLa-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

HeLa S3 Tet Off:

Menschliche Zervixkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression des Tet-Regulators; kommerziell erhältlich (Clontech). HeLa Tet Off-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert und bei Bedarf mit Doxycyclin induziert.

2.1.6 Kulturmedien für Hefen und Bakterien

Für die Aufzucht von Hefe- und *E. coli* Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Guthrie and Fink, 1991; Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1988). Die Medien wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Um Maillardreaktionen zu vermeiden wurde die D-Glukose erst nach der Sterilisation zugegeben.

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

2.1.6.1 Hefemedien

Vollmedium (YPD) pH 5,5: 1% Hefe-Extrakt
 2% Bacto-Pepton
 2% D-Glukose

Selektionsmedium pH 5,6: 0,67 % Yeast-Nitrogenbase w/o aminoacids
 1x Drop-out Lösung
 2% D-Glukose

Adenin, Uracil und die Aminosäuren Histidin, Leucin, Lysin und Tryptophan wurden, soweit nicht Auxotrophiemarker, aus Stocklösungen zugegeben.

10x Drop-Out-Lösung (1l): 300 mg L-Isoleuzin
 1500 mg L-Valin
 200 mg L-Arginin-HCl
 200 mg L-Methionin
 500 mg L-Phenylalanin
 2000 mg L-Threonin
 300 mg L-Thyrosin

100x Adenin (100 ml): 200 mg L-Adenin-Hemisulfat
100x Histidin (100 ml): 200 mg L-Histidin HCl Monohydrat; sterilfiltrieren
100x Leucin (100 ml): 1000 mg L-Leucin
100x Lysin (100 ml): 300 mg L-Lysin HCl
100x Tryptophan (100 ml): 200 mg L-Tryptophan; sterilfiltrieren
100x Uracil (100 ml): 200 mg L-Uracil

2.1.6.2 Medien für *E. coli* Kulturen

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

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

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

YNEB-Medium pH 7,4: 0,75% Hefe-Extrakt
0,8% "Nutrient Broth"

Minimalmedium (für KC8): 1x M9-Salze
1 mM MgSO₄
0,2 % Glukose
2 mg Vitamin B1 (50 mg/ml Stocklösung)
0,165 M CaCl₂
1x Aminosäurestocklösungen
ad 1 l dest. Wasser

M9-Salze (10x): 128 g Na₂HPO₄·7H₂O
30 g KH₂PO₄
5 g NaCl
10 g NH₄Cl
ad 1 l dest. Wasser

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Expressionsplasmide

RSV-GR:

Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher; enthält die cDNA des humanen GR im Expressionsvektor RSV.

RSV-GR_{mH12}:

Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher; enthält die cDNA des humanen GR mit einer Punktmutation in der Helix 12 (E755Q) im Expressionsvektor RSV.

RSV-GR_{mH12ΔAF-1}:

Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher; enthält die cDNA des humanen GR mit einer Punktmutation in der Helix12 (E755Q) und einer zusätzlichen kompletten Deletion der AF-1 im Expressionsvektor RSV.

RSV-GR_{mDBD}:

Enthält die cDNA des humanen GR mit den Punktmutationen C476W/R479Q; der die entsprechende Mutationen tragende Teilbereich wurde als *EcoRI/ClaI*-Fragment aus phGR-C476W/R479Q (Heck et al., 1994) in RSV-GR kloniert.

pRShR:

Zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher; Kontrollvektor ohne Glukokortikoidrezeptor cDNA-Sequenz (Cato und Ponta, 1989).

pcDNA3.1-HA:

Enthält das Hämagglutinin Epitop aus *Hämophilus influenzae* mit vorangehender Kozak-Sequenz als *HindIII/EcoRI* Fragment aus pCHB (zur Verfügung gestellt von C. Englert, FZK) in pcDNA3.1+;

Kozaksequenz: AAGCTTCCGGCC

Leserahmen: AGC CTG GGA ATT CTG CAG ATA TCC

EcoRI *EcoRV*

pcDNA3.1-Flag:

Enthält das Flag-Epitop in pcDNA3.1+; das Flag-Epitop mit vorangehender Kozak-Sequenz wurde durch ein doppelsträngiges Oligonukleotid eingeführt (zur Verfügung gestellt von B. Lutz, FZK);

Kozaksequenz: GCCCGCCACC

Leserahmen: GGT ACC GAG CTC GGA TCC ACT

KpnI *BamHI*

pcDNA3.1-Trip6:

Enthält die cDNA des humanen Trip6; diese cDNA wurde aus HeLa-cDNA unter Verwendung der Trip6_{forw} und Trip6_{rev} Primer amplifiziert und als *EcoRI/XhoI*- Fragment in pcDNA3.1+ kloniert.

pcDNA3.1-#198:

Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ aus pGAD GH-#198.

pcDNA3.1-HA-#198:

Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) als *EcoRI* (blunt)/*XhoI* Fragment aus pGAD GH-#198 in pcDNA3.1-HA (ebenfalls *EcoRI*(blunt)/*XhoI*).

pcDNA3.1-HA-Trip6:

Enthält die cDNA des humanen Trip6 als *EcoRI*(blunt)/*XhoI* Fragment aus pcDNA3.1-Trip6 in pcDNA3.1-HA (ebenfalls *EcoRI*(blunt)/*XhoI*).

pcDNA3.1-Flag-Trip6:

Enthält die cDNA des humanen Trip6 als *EcoRI/XhoI* Fragment aus pcDNA3.1-Trip6 in pcDNA3.1-Flag.

pcDNA3.1-HA-GR:

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

pcDNA3.1-Gal4_{DBD}:

Enthält die Gal4 als *HindIII/BamHI* Fragment aus pAS1-CYH2 in pcDNA3.1+ ;

Leserahmen: GCC ATG GAG GCC CCG GGG ATC CAC TAG TCC AGT GTG

NcoI

SmaI

BamHI

pcDNA3.1-Gal-Trip6:

Enthält die Trip6 cDNA fusioniert an Gal4_{DBD}; die Gal4_{DBD} wurde aus pAS1-CYH2 (Clontech) als *HindIII/BamHI* (blunt) Fragment in pcDNA3.1-Trip6 (geschnitten mit *HindIII/EcoRI* (blunt)) kloniert

pcDNA3.1-Gal-#198:

Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) fusioniert an Gal4_{DBD}; die Gal4_{DBD} wurde aus pAS1-CYH2 als *HindIII/BamHI* (blunt) Fragment in pcDNA3.1-#198 (geschnitten mit *HindIII/EcoRI* (blunt)) kloniert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₁₋₇₀:

Enthält die Trip6 cDNA bis zur Aminosäure 70 fusioniert an Gal4_{DBD}; das Ausgangsplasmid pcDNA3.1-Gal-Trip6 wurde hierzu mit *PpuMI/XbaI* geschnitten, gebluntet und das erhaltene Vektorfragment religiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₇₀₋₄₇₆:

Enthält die Trip6 cDNA ab der Aminosäure 70 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Gal4_{DBD} wurde aus pAS1-CYH2 als *HindIII/SmaI* Fragment in pcDNA3.1-Trip6 (geschnitten mit *HindIII/PpuMI* (blunt)) kloniert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₁₋₁₉₀:

Enthält die Trip6 cDNA bis zur Aminosäure 190 fusioniert an Gal4_{DBD}; das Trip6 Fragment bis Aminosäure 190 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-Trip6 unter Verwendung

der Primer Tip6_{forw} und P#198_{rev} amplifiziert und durch eingefügte Schittstellen als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₁₋₂₈₀:

Enthält die Trip6 cDNA bis zur Aminosäure 280 fusioniert an Gal4_{DBD}; das Trip6 Fragment bis Aminosäure 280 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-Trip6 unter Verwendung der Primer Tip6_{forw} und N-Term_{rev} amplifiziert und durch eingefügte Schittstellen als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₇₀₋₂₈₀:

Enthält die Trip6 cDNA von Aminosäure 70 bis 280 fusioniert an Gal4_{DBD}; das Trip6 Fragment von Aminosäure 70 bis 280 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-Gal-Trip6₇₀₋₄₇₆ unter Verwendung der Primer T7 und N-Term_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6₁₉₀₋₂₈₀:

Enthält die Trip6 cDNA von Aminosäure 190 bis 280 fusioniert an Gal4_{DBD}; das Trip6 Fragment von Aminosäure 190 bis 280 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer T7 und N-Term_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim1:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domäne 1 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 1 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim1_{forw} und Lim1_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim2:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domäne 2 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 2 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim2_{forw} und Lim2_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1- Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim3:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domäne 3 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domäne 3 wurde mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim3_{forw} und Lim3_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1-Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim1+2:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domänen 1 und 2 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domänen 1 und 2 wurden mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim1_{forw} und Lim2_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1- Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim2+3:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domänen 2 und 3 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domänen 2 und 3 wurden mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim2_{forw} und Lim3_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1- Gal4_{DBD} umklontiert.

pcDNA3.1-Gal-Trip6Lim1-3:

Enthält die Trip6 cDNA der Lim-Domänen 1 bis 3 fusioniert an Gal4_{DBD}; die Lim-Domänen 1 bis 3 wurden mit Hilfe einer PCR vom Template pcDNA3.1-#198 unter Verwendung der Primer Lim1_{forw} und Lim3_{rev} amplifiziert und als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1+ kloniert. Anschließend wurde die cDNA als *EcoRI/XbaI* Fragment in pcDNA3.1- Gal4_{DBD} umklontiert.

Gal-TR:

Enthält die Thyroidhormonrezeptor cDNA fusioniert an Gal4_{DBD}; zur Verfügung gestellt von T. Heinzel (Georg Speyer Haus, Frankfurt).

Antisense-Trip6:

Enthält die der Trip6 cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) kodierende komplementäre Sequenz; die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) wurde hierzu als *EcoRI/XhoI* Fragment in pcDNA3.1- kloniert.

Tet-Off Antisense-Trip6:

Enthält die der Trip6 cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) kodierende komplementäre Sequenz unter der Kontrolle eines Tetracyclin responsiven Promotors; die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) wurde hierzu als *HindIII/NheI* Fragment in pBI-L (Clontech) kloniert.

pSV40-Puro:

Enthält das Puromycinresistenzgen unter der Kontrolle des SV40 Promotors im pBR322 Vektor; zur Verfügung gestellt von B. Baumann (Universität Würzburg)

2.1.7.2 Hefepiasmide**pRS415-PT:**

Enthält den Promotor der Alkoholdehydrogenase (als *EcoRV/HindIII* Fragment aus pAS1-CYH2 in den Schnittstellen *XhoI* (blunt)/*HindIII*) und den Terminator der Alkoholdehydrogenase (als *EcoRI/SphI* (blunt) Fragment aus pAS1-CYH2 in den Schnittstellen *EcoRI* /*SpeI* (blunt)) im Hefvektor pRS415 (Stratagene).

pRS415-GR:

Enthält die cDNA des humanen GR; der GR wurde als *BamHI/Xba*(blunt) Fragment aus pMThGR (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher) in pRS415-PT (geschnitten mit *BamHI/PstI* (blunt)) kloniert.

Gal_{DBD}-GR_{wt}:

Enthält die cDNA des humanen GR ab der Aminosäure 262 fusioniert an die Gal4_{DBD} im Vektor pRS414; das Plasmid wurde in drei Schritten hergestellt:

Eine Gal_{DBD}-Fusion der Aminosäuren 262 bis 510 des humanen GR wurde über *EcoRV/PstI* aus pAS1-CYH2-GR₂₆₂₋₂₇₀ (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher) in pRS414 (geschnitten mit *XhoI* (blunt)/*PstI*) umklontiert;

Der Terminator der Alkoholdehydrogenase wurde aus dem Vektor pAS1-CYH2 als *PstI/SphI* (blunt) Fragment in die oben beschriebene Vektorvorstufe in die Schnittstellen *PstI/SpeI* (blunt) eingefügt;

Die Ligandenbindedomäne des humanen GR wurde als *Clal/XbaI* (blunt) aus pMThGR über die Schnittstellen *Clal/PstI* (blunt) eingefügt.

pAS1-GR_{mH12ΔAF-1}:

Als Ausgangsvektor diente die in Absatz 2 beschriebene Zwischenstufe des Gal_{DBD}-GR_{wt}. Die Punktmutation enthaltende Ligandenbindedomäne wurde als *Clal/XbaI* (blunt) Fragment in die Schnittstellen *Clal/PstI* (blunt) aus pMThGR_{mH12} eingefügt.

pAS1-GR_{mDBD}:

Als Ausgangsvektor diente ebenfalls die in Absatz 2 beschriebene Zwischenstufe des Gal_{DBD}-GR_{wt}. Die Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne wurde als *Clal/PfIMI* (blunt) Fragment in die Schnittstellen *Clal/PstI* (blunt) aus GR4(15) (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK) eingefügt.

2.1.7.3 Plasmide für *in vitro* Translation

pBATcJun:

Enthält die komplette cDNA von cJun im pBAT-Vektor; zur *in vitro*-Translation muß die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von A.C.B. Cato, FZK).

pGEMFos3:

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

pBSKp65:

Enthält die komplette cDNA von RelA (p65) im Blueskript SK(+)-Vektor; zur *in vitro*-Translation muß die RNA-Polymerase T3 verwendet werden (zur Verfügung gestellt von F. Weih, FZK).

2.1.7.4 Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen

pGEX-4T-3:

Ausgangsvektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen (Promega, Mannheim), in Bakterien exprimiert liefert er die Glutathion-S-Transferase.

pGEX-#198:

Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) fusioniert an GST; die cDNA wurde als *EcoRI/XhoI* Fragment in pGEX-4T-3 kloniert.

2.1.7.5 Plasmide für die Produktion von HIS-Fusionsproteinen

pET28a:

Ausgangsvektor für die Expression von HIS-Fusionsproteinen (Novagen, Schwalbach).

pET28a-#198:

Enthält die cDNA des längsten Two-Hybrid Isolats (#198) als *EcoRI*(blunt)/*XhoI* Fragment in pET28a (geschnitten *HindIII*(blunt)/*XhoI*).

2.1.7.6 Reporter

-517/+63 Coll-Luc:

Enthält den Bereich -517 bis +63 des menschlichen Kollagenase I-Promotors kloniert in die Luziferase-Kassette des Plasmids pXP2 (Schneikert et al., 1996).

pHC_{wt} Luc:

Enthält den Bereich -237 bis +125 des MMTV-LTR kloniert in die Luziferase-Kassette des Plasmids pXP2 (Heck et al., 1997).

Ubi-Renilla:

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

GRE-LacZ:

Enthält zwei funktionelle GR-Bindestellen (GREs) in einem pRS424-LacZ Reporterplasmid; die GREs wurden als *BamHI* (blunt)/*XhoI* Fragment aus GRE₂-Tk-81Luc (zur Verfügung gestellt von M.Göttlicher) in die Schnittstellen *XhoI* (blunt)/*Sall* des pRS424-LacZ Reporters eingefügt (zur Verfügung gestellt von H. Rudolf, Stuttgart).

Gal5Tk-109 Luc:

Enthält die Region -109 bis +52 des Thymidin-Kinase Promotors mit fünf Gal4-Bindestellen (zur Verfügung gestellt von H. van Dam, Leiden).

pGL3-Tk-Luc:

Enthält die Region -109 bis +52 des Thymidin-Kinase Promotors in dem Vektor pGL3-Basic (Promega, Mannheim); (zur Verfügung gestellt von M. Malewicz, FZK).

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 Zur Verwendung in der PCR:

Trip6_{forw}: 5'-AGAATTCCAGGCCATGTCGGGG-3'
Trip6_{rev}: 5'-GACTCAGCAGTCAGTGGTGACGGTGGC-3'
P#198_{rev}: 5'-ACTCGAGAGGCCTGAGAGGCTCC-3'
N-Term_{rev}: 5'-ACTCGAGACTGGCCAAAGTACTCCCC-3'
Lim1_{forw}: 5'-AGAATTCCACCCGCCAGCGGG-3'
Lim1_{rev}: 5'-ACTCGAGCCAGGGTGGCCACGTA-3'
Lim2_{forw}: 5'-AAGAATTCGTGGCCACCCTGGAG-3'
Lim2_{rev}: 5'-ACTCGAGGGGCAAACCTCCTGTG-3'
Lim3_{forw}: 5'-AGAATTCAGGAAGTTTGCCCCAAG-3'
Lim3_{rev}: 5'-ACTCGAGTGATCAATCAAAGG-3'

2.1.8.2 Zur Sequenzierung von Trip6:

SEQ1: 5'-CATGGAGTACTCCAGCAC-3'
SEQ2: 5'-CCTCTTACACTACCGCC-3'
SEQ3: 5'-CCATCCCCAACCACATC-3'
SEQ4: 5'-GAGTACTTTGGCCAGTG-3'
SEQ5: 5'-AAGGCCTACCAGCCTG-3'

2.1.8.3 Zur Sequenzierung der Genbankplasmide:

Gal4TAD: 5'-TACCACTACAATGGATG-3'

2.1.9 Antikörper

12CA5: monoklonaler Mausantikörper gegen das HA-Epitop;
hier Verwendung eines Hybridomaüberstandes, zur Verfügung gestellt von
C. Englert, FZK;
Verdünnung im Westernblot 1:100;
Verdünnung für Immunofluoreszenz 1:10.

Gal4-TA (C-10): monoklonaler Mausantikörper gegen die Transaktivierungsdomäne von
Gal4; Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg); Katalognummer sc-1663;
Verdünnung im Westernblot 1:250.

Flag-probe (D-8)-G: Polyklonaler Ziegenantikörper gegen das Flag-Epitop; Santa Cruz
Biotechnology (Heidelberg); Katalognummer sc-807-G;
Verdünnung für Verwendung im Westernblot 1:1000.

Trip6: Polyklonales Kaninchenserum gegen den vom längsten Two-Hybrid Isolat (#198) kodierten Bereich von Trip6; hergestellt von Genosys Biotechnologies (Pampisford, UK); Verdünnung im Westernblot 1:500-1:1000; Verdünnung für Immunopräzipitationen 1:50; Verdünnung für Immunofluoreszenz 1:50.

anti-Maus HRP: Peroxidase konjugiertes Ziegen anti-Maus Immunoglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer P 0447; Verdünnung im Westernblot 1:2000.

anti-Kaninchen HRP: Peroxidase konjugiertes Ziegen anti-Kaninchen Immunoglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer P 0448; Verdünnung im Westernblot 1:2000.

anti-Maus FITC: FITC-konjugiertes Kaninchen anti-Maus Immunoglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer F 0261; Verdünnung für Immunofluoreszenz 1:50.

anti-Kaninchen TRITC: TRITC-konjugiertes Schwein anti-Kaninchen Immunoglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer R 0156; Verdünnung für Immunofluoreszenz 1:50.

anti-Ziege FITC: FITC-konjugiertes Kaninchen anti-Ziege Immunoglobulin; Dako (Hamburg); Katalognummer F 0250; Verdünnung für Immunofluoreszenz 1:50.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Transfektionsmethoden

2.2.1.1 Kulturbedingungen

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

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

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

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

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

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

Einfriermedium: DMEM + 20% FCS + 10% DMSO

2.2.1.4 Kalziumphosphat-Transfektion von Zellen

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsiniert und in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro 3 ml Medium in einer 6-well-Schale eingesät. Für den Transfektionsmix wurden 1-2 µg DNA in 250 mM CaCl₂ gelöst und dann Tropfen für Tropfen mit dem gleichen Volumen 2x HBS gemischt. Nach 20 bis 40 min auf Eis wurde das Kalziumphosphat/DNA-Präzipitat tropfenweise, über die Zellkulturschale verteilt, ins Medium gegeben. Die Zellen wurden 5-16 h im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde ca. 1 ml 15% Glycerin in PBS ohne Kalzium und Magnesium zugegeben und genau 2 min auf den Zellen belassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen für weitere 8-24 h im Brutschrank inkubiert. Für Kollagenasereporteranalysen wurden die Zellen

24 h nach der Transfektion für 16 h mit TPA (60 ng/ml) und mit TPA und Dexamethason (10^{-7} M) behandelt.

2x HBS: 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM HEPES
PBS (ohne Ca und Mg): 123 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 2,5 mM KH_2PO_4

2.2.1.5 Transfektion mit DEAE-Dextran

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsinisiert und in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro 3 ml Medium in einer 6-well-Schale eingesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für den Transfektionsmix wurden 1-2 μg DNA in TBS mit 0,5 mg/ml DEAE-Dextran gelöst und 400 μl pro well aufgebracht. Nach 30 min Inkubation bei RT (alle 5 min schwenken) wurden pro well 3 ml DMEM mit 0,5% FCS zu dem Transfektionsmix gegeben und die Zellen weitere 4-6 h im Brutschrank bei 37°C und 6% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für weitere 16-24 h in DMEM mit 10% FCS inkubiert.

TBS: 25 mM Trisbase, 137 mM NaCl; 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 ,
0,6 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4
DEAE-Dextran: Stocklösung 10 mg/ml in TBS

2.2.1.6 Transfektion durch Elektroporation

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsinisiert und in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen in eine $\text{Ø}16$ cm Gewebekulturschale eingesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, und in DMEM ohne FCS in einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ pro 200 μl aufgenommen. Pro Elektroporation wurden 3-20 μg DNA in 20 μl Wasser mit 200 μl Zellsuspension gemischt und in eine Elektroporationküvette (Spaltbreite 0,4 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 220 mV und einer Kapazität von 250 μF am Gene-Pulser (BioRad, München). Ca. 5 min nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml DMEM mit 10% FCS aufgenommen, gut resuspendiert, in eine $\text{Ø}10$ cm Gewebekulturschale überführt und im Brutschrank bei 37°C und 6% CO_2 inkubiert. Nach 16-24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

2.2.1.7 Herstellen von stabilen Zelllinien

Stabile Zelllinien wurden durch Verwendung von Antibiotikaselektionsmarkern hergestellt. Nach Calcium-Phosphat Transfektion oder Elektroporation des gewünschten Plasmids, zusammen mit dem Resistenzgen (Verhältnis 10:1) wurden die Zellen über Nacht in DMEM mit 10% FCS kultiviert und am nächsten Tag in Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet. Ab dem darauffolgenden Tag wurde das zur Selektion verwendete Antibiotikum in einer zuvor bestimmten tödlichen Dosis in

DMEM mit 10% FCS zu den Zellen gegeben. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Medium gewechselt und gegen neues Selektionsmedium ersetzt. Sobald Klone zu sehen waren, wurde die Selektion beendet und die Zellen wieder in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Die Klone wurden einzeln von den Platten gepickt und expandiert.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

Phenol/Chloroform Extraktion

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

Fällung von Nukleinsäuren

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

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5% Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25 µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 1x TAE gegeben und im Mikrowellenherd aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Lauffpuffer (1x TAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung

erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

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

2.2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde am UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des Easy-Pure Kits (Biozym, Hameln) nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro 100 µg Gelstück wurden 300 µl Salt-Lösung und 5 µl Bind verwendet. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit 20 µl Wasser eluiert und direkt für Ligationen oder andere Anwendungen eingesetzt.

2.2.2.4 Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Minilösung1 (M1) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung und Mischen wurden 150 µl 3 M Natriumazetat zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienreste bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit 1 ml Ethanol präzipitiert (30 min bei -20°C) und durch 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

M1: 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0
alkalische Lösung: 0,2 M NaOH; 1% SDS

2.2.2.5 Plasmid-DNA Maxi-Präparation

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3600g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysate wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und bei 10000g 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip AX-500-Säulen (Diagen, Düsseldorf) laut Herstellerprotokoll.

Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

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

2.2.3 Klonierungstechniken

2.2.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA

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

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

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

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

2.2.3.3 Auffüllen von 5'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1x Polymerase-Puffer versetzt.

Nach 30 min Reaktion bei 30°C erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Dabei werden 3'-Überhänge abgebaut.

dNTP-Mix: je 10 mM dATP; dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5
1x Polymerase-Puffer: 7 mM Tris pH 7,5; 7 mM MgCl₂; 50 mM NaCl

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

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

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

2.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

2.2.4.1 Chemisch kompetente *E. coli* Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1blue wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 20 ml Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (meist 800 ml) im Verhältnis 1/100 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A6.9, 5000 UpM, 10 min, 4°C) wurden diese mit jeweils 10 ml pro 50 ml Orginalkultur eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und anschließend ebenfalls in 10 ml pro 50 ml Orginalkultur eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 1 h auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert und in 1/30 bis 1/50 des Orginalvolumens in 50 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und in 200 µl Aliquots abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 100 µl Zellsuspension verwendet.

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

2.2.4.2 Elektrokompente *E. coli* Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1blue wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 20 ml Vorkultur in YNEB angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C

über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (meist 800 ml) im Verhältnis 1:100 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrikon H-401, Rotor A6.9, 5000 UpM, 10 min, 4°C) wurde das Bakterienpellet zweimal mit sterilem, eiskaltem Wasser gewaschen und in 2-4 ml 10% Glycerin aufgenommen. Jeweils 40 µl Aliquots wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut.

2.2.5 Transformation kompetenter Bakterien

2.2.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien:

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

2.2.5.2 Transformation durch Elektroporation:

Pro Transformation wurde ein 40 µl Aliquot kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-5 µl DNA (am besten in Wasser) wurden die Bakterien auf Eis für 1 min inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF am GenePulser (BioRad, München). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB/Amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

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

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Perkin-Elmer-Cyclor (Norwalk, USA): 1/10 Volumen 10x PCR-Puffer, 1/10 Volumen 10x dNTP-Lösung, je 1/10 Volumen 10x Primer (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann).

Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

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

2.2.7 Sequenzierung von DNA

2.2.7.1 mit ³³P markierten Didesoxy-NTPs:

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

95°C, 30 s;

55°C, 30 s;

72°C, 1 min, 30-60 Zyklen.

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

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

2.2.7.2 mit dem Vistra DNA Sequenzierer 725

Texas Red markierte Primer (2 pmol) wurden mit ca.1 µg gereingter Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt. Jeweils 6 µl wurden in vier markierte PCR-Gefäße (ACGT) pipettiert und 2 µl des jeweiligen Terminationsmixes zupipettiert (fertig gemischte Enzym- und ddNTP-Lösung, *Cycle sequencing kit*, Amersham Pharmacia Biotech). Die Proben wurden in einem Perkin-Elmer-Cycler unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

Einmal 94°C, 4 min; dann 20 bis 25 Zyklen

94°C, 30 s;

50°C, 15 s;

72°C, 30 s.

Nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer wurden die Proben auf 2-3 µl Volumen eingeeengt und anschließend auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamid/8,3 M Harnstoff-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Vistra DNA Sequenzierer 725 zugehörigen Software

2.2.8 Protein-Methoden

2.2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 500 µl mit Lösung I aufgefüllt und dann mit 1 ml Lösung II gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl Lösung III zugegeben und für weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannter Proteinkonzentration parallel dazu verarbeitet. Je 300 µl des Reaktionsansatzes wurden dann in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 660 nm im ELISA-Reader (Titertek Multiskan PLUS) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

Lösung I: 2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
Lösung II: 2% NaK-Tartrat : 1% CuSO₄ x 5H₂O : Lösung I = 100:100:1
Lösung III: 50% Folin-Ciocalteus-Reagenz (in Wasser verdünnt)

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

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Isopropanol läßt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernt man das Isopropanol und gießt die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines Kammes läßt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit einfachem Volumen 2x Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 20 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel entweder direkt oder nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau getrocknet oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Westernblot). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker (SDS 7B, Sigma) mitgeführt.

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

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

Proteine, die in SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung und danach in den Entfärbelösungen 1 und 2 inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

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

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

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer Naßtransferzelle (Trans-Blot, BioRad, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Zelle wurde mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte entweder über Nacht mit 60 mA oder

2 h mit 600 mA bei 4°C. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 5% fettfreier Milch in TBST geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in TBST gewaschen und danach 1 h mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm² Membranfläche, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 10% Methanol
TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH7,6
TBST: TBS + 0,05% Tween 20

2.2.8.5 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten

Für die Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten wurden $5 \cdot 10^6$ - 10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt, in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt und abzentrifugiert (500g, 2 min). Anschließend wurden die Zellen in 100-200 μ l Lysispuffer aufgenommen und für 5 min auf Eis lysiert. Die Lyse der Zellen wurde mikroskopisch verfolgt, damit die Lyse nicht zu weit voranschreitet und die Kerne beschädigt werden. Die intakten Kerne wurden vom Zytoplasmaextrakt durch Zentrifugation (1000g, 5 min, 4°C) abgetrennt und anschließend mit 100 μ l RIPA-Puffer lysiert. Der so erhaltene Kernextrakt wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, sonifiziert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der Zytoplasmaextrakt wurde nochmals durch Zentrifugation bei 13000g für 25 min bei 4°C von eventuellen Zelltrümmern befreit, ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versetzt, sonifiziert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Lysis-Puffer: 10 mM HEPES-KOH; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,5% NP-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; pH7,9
RIPA-Puffer: 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Natrium Desoxycholat; 0,1% SDS

2.2.8.6 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

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

Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurde die Expression des Fusionsproteins mit 1mM IPTG induziert und die Bakterien nach weiteren 2-4 h durch Zentrifugation (3000g, 10 min, 4°C) sedimentiert, in eiskaltem Puffer E (5% des Kulturvolumens) resuspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Gegenwart von 1 mg/ml Lysozym lysiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die bakterielle DNA wurde mechanisch mit Ultraschall geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile

durch Zentrifugation (10000g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS gequollener Glutathion-Agarose (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein) für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Lag die Glutathion-Agarose bereits vorgequollen in 20 % Ethanol vor, so wurde von dieser 1:1 Lösung 1 ml verwendet und vor Gebrauch zweimal mit PBS gewaschen. Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 5 mM reduzierten Glutathion (in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) in Fraktionen aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft und die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen eiskaltes PBS (+10% Glycerin) über Nacht dialysiert. So gereinigtes Fusionsprotein wurde bei -80°C gelagert.

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

2.2.8.7 Produktion und Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

Eukaryontische Proteine können auch durch Fusion mit einem Histidin-Tag (6 Histidinreste in folge) in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden. Die Aufreinigung erfolgt über die Bindung des His-Fusionsproteins an Nickelbeads durch Metall-Affinitäts-Chromatographie. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde hierzu in den Vektor pET-28a, b oder c (das Leseraster der Insertionsstelle ist jeweils um ein Nukleotid verschoben - damit stehen alle drei Leseraster zur Verfügung) an das 3'-Ende des His-Tags fusioniert. Zur Expression des Fusionsproteins in BL21 wurde aus einer stationären Vorkultur (20 ml), die Hauptkultur in LB mit 25 µg/ml Kanamycin im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Durch die Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach weiteren 3-5 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000g, 20 min, 4°C) geerntet und die Bakterienmasse in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Auftauen der Zellen wurden sie in 5 ml Puffer B pro Gramm Naßgewicht resuspendiert und 15-60 min bei RT gerührt bzw. geschüttelt. Die bakterielle DNA wurde mechanisch im Ultraschall geschert und die Suspension anschließend zentrifugiert (10000g, 30 min, RT). Zu dem geklärten Überstand wurden 1 ml einer 50%

Suspension der Ni-NTA Matrix (Quiagen) zugegeben und 15-60 min bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Säule umgefüllt und 2 mal mit 4 ml Puffer C gewaschen. Das Fusionsprotein wurde zuerst in 4 mal 0,5 ml Fraktionen von Puffer D und anschließend in 4 mal 0,5 ml Fraktionen von Puffer E eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft und die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen eiskaltes PBS (+10% Glycerin) dialysiert. So gereinigtes Fusionsprotein wurde bei -80°C gelagert.

Puffer B: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0
Puffer C: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3
Puffer D: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 5,9
Puffer E: 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl, pH 4,5
pH-Werte kurz vor Gebrauch überprüfen!

2.2.8.8 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen ***In vitro* Transkription/Translation**

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

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

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

GST-Fusionsprotein-Interaktionstest

Die Interaktion zweier Proteine wurde mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen und *in vitro* translatierten Proteinen untersucht. Hierbei macht man sich die Affinität von GST-Fusionsproteinen zu immobilisiertem Glutathion zunutze. 10 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurden an 20 µl Glutathion-Agarose (1:1 in PBS ohne Kalzium und Magnesium) in einem Mindestvolumen von 800 µl PBS (mit 1 mM DTT) für 20 min bei RT und 1 h bei 4°C unter Rotieren gebunden. Anschließend wurde die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Agarose mit 5 µl des entsprechenden *in vitro* translatierten, ³⁵S-markierten Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl PD-Puffer gemischt. Unter Rotieren für 15 min bei RT und 1 h bei 4°C wurde eine potentielle Interaktion der beiden Partnerproteine ermöglicht. Daraufhin wurde die Glutathion-Agarose durch wiederholtes Zentrifugieren (1 min, 6000g) dreimal mit eiskaltem PD-Puffer gewaschen. Alle Proben wurden während dieser Zeit auf Eis gehalten. Die an das Glutathion gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zugabe von 2x Probenpuffer sowie Mischen und Erhitzen für 5 min bei 95°C von der Glutathion-Agarose eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung mittels einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Autoradiographie bei -80°C.

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

2.2.8.9 Immunofluoreszenzfärbung intrazellulärer Proteine

Für die Immunofluoreszenz wurden transient transfizierte oder nicht-transfizierte Cos7 oder HeLa-Zellen verwendet. $2,5 \cdot 10^5$ Zellen (evt. bereits transfiziert) wurden am Vortag in 6-well-Platten ausgesät, in die zuvor sterilisierte Deckgläschen (22x22mm) gelegt wurden. Die Zellen wurden über Nacht auf den Deckgläschen kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer 3% Paraformaldehyd-Lösung für 20 min fixiert. Um überschüssiges Paraformaldehyd abreagieren zu lassen, wurden die Zellen 15 min in 50 mM NH₄Cl (in PBS) inkubiert und anschließend mit 0,1% Triton-X100 (in PBS) für 5 min permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS mit 3% FCS (PBS-3% FCS) für 1 h geblockt.

Alle weiteren Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde in den Deckel der 6-well-Platte ein Stück feuchtes Whatmanpapier gelegt.

Nach komplettem Absaugen der Flüssigkeit wurde der erste Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 150 µl PBS-3% FCS direkt auf das Deckglas pipettiert und 1 h

bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-3% FCS gewaschen und der sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 150 µl PBS-3% FCS direkt auf das Deckglas pipettiert. Nach 30-60 min Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS-3% FCS gewaschen und anschließend die Zellkerne mit Hoechstfarbstoff (H33258) für 5 min gefärbt (Verdünnung 1:1000 in PBS-3% FCS).

Nach Beendigung der DNA-Färbung wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Deckgläschen aus den 6-well-Platten gehoben und kurz durch Eintauchen in dest. Wasser gewaschen. Die leicht angetrockneten Deckgläschen wurden auf der mit Zellen bewachsenen Seite mit einem Tropfen Einbetttharz (Dako, Fluorescence mounting medium) versehen und mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Ränder mit einem farblosen Nagellack abgeschlossen.

Bis zur Betrachtung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Herstellen der Paraformaldehyd Lösung

Anstelle der kommerziellen 37% Formaldehydlösung (mit 10-15% Methanol stabilisiert) sollte kristallines Paraformaldehyd verwendet werden, das nach Auflösen in Wasser Formaldehyd freisetzt. Zur Herstellung einer 10% Paraformaldehyd-Stocklösung wurden 20 g in 100 ml Wasser gelöst und unter dem Abzug auf 60°C erhitzt. Die Löslichkeit wurde durch Zugabe einiger Tropfen NaOH verbessert. Die klare Flüssigkeit wurde nach Abkühlen mit 100 ml 2x PBS versetzt und konnte bei -20°C aufbewahrt werden. Für den Gebrauch wurde die Stocklösung mit PBS verdünnt.

2x PBS: 274 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,4 mM CaCl₂; 1,2 mM MgCl₂; 10 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄

2.2.8.10 Immunopräzipitation von *in vitro* translatiertem Trip6

Trip6 wurde mit Hilfe des *TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Mannheim) wie bereits oben beschrieben unter Verwendung des pcDNA3.1-Trip6 Plasmides in Anwesenheit von L-[³⁵S]-Methionin *in vitro* translatiert. Jeweils 10 µl des Translationsansatzes wurden mit 480 µl IP-Puffer, mit 10 µl des polyklonalen Kaninchenserums oder mit 10 µl des vom gleichen Kaninchen stammenden Präimmunerums bei 4°C für 1 h unter Rotieren inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 20 µl Protein-A-Sepharose versetzt (zuvor im IP-Puffer resuspendiert) und nochmals für 1 h unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde bei 360g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Präzipitat dreimal mit IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat in 50 µl 2x Probenpuffer aufgenommen. Der abgenommene Überstand wurde mit 5x Probenpuffer versetzt. Als Kontrolle für die eingesetzte Menge wurde 1 µl des Translationsansatzes mit 20 µl 2x Probenpuffer versetzt.

Alle erhaltenen Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und anschließend einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographiert.

IP-Puffer: 50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA;
0,1% Tween 20; 10 % Glycerin; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin und
Aprotinin
5x Probenpuffer: 12,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerin; 0,05% Bromphenolblau;
5% 2-Mercaptoethanol

2.2.9 RNA

2.2.9.1 Präparation von PolyA⁺-RNA aus Zellen

Zur Präparation von PolyA⁺-RNA aus Zellen wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät und für 24 Stunden mit ihrem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS gewaschen und mit 10 ml sterilem STE abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines Ultra-TuraxTM-Homogenisators (Janke und Kunker GmbH & CoKG, Staufen) für 30 s geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die NaCl-Endkonzentration auf 0,5 M eingestellt wurde, wurden pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB zugegeben. Unter ständigem Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die PolyA⁺-RNA an die Oligo-dT-Zellulose gebunden. Diese Suspension wurde in autoklavierte Kunststoffsäulen überführt und dann dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Die Elution der PolyA⁺-RNA erfolgte einmal mit 2 ml und einmal mit 3 ml Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mit 400 µl des Eluats spektralphotometrisch bestimmt. Das verbleibende Eluat wurde mit 3 M NaAc pH 4,8 auf die Endkonzentration 0,2 M eingestellt und zusammen mit Hefe-tRNA (10µg/ml) als Fällungshilfe und dem 2,5 fachen Volumen an Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA bei 10000g und 4°C für 30 min zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die RNA wurde mit Wasser zu einer Konzentration von 0,5 µg/µl aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄
STE: 20 mM Tris-HCl, pH7,4; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 µg/ml Proteinase K
HSB: 10 mM Tris-HCl, pH7,4, 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% SDS

Regeneration der Oligo-dT-Zellulose

Die Oligo-dT-Zellulose konnte nach Gebrauch regeneriert und somit mehrmals wiederverwendet werden. Zuerst wurde sie zweimal in 0,1 M NaOH mit 5 mM EDTA durch wiederholtes Zentrifugieren bei 1000g gewaschen. Anschließend wurde die Oligo-dT-Zellulose fünfmal mit Wasser und abschließend zweimal mit HSB gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Oligo-dT-Zellulose in HSB bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9.2 Herstellung von cDNA aus PolyA⁺-RNA

Für die Erststrang-Synthese wurden 1 µl Oligo(dT)12-18-Primer (100 ng/µl) mit 0,5 bis 1 µg PolyA⁺-RNA gemischt und auf 12 µl mit sterilen Wasser aufgefüllt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Nach Abschrecken auf Eis wurden 4 µl des 5x Erststrang Synthese Puffers, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes zugegeben. Nach Inkubation auf 42°C wurde 1 µl (200 Units) der SuperScriptTM-Reversen Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) zugegeben und die Reaktion für 1 -1,5 h bei 42°C inkubiert.

Die Zweitstrangsynthese erfolgte direkt aus dem obengenannten Ansatz durch Zugabe von 20 U *E.coli* DNA-Ligase; 50 U *E. coli* DNA Polymerase; 1 U *E. coli* RNaseH; 6 µl 0,1 M DTT; 3 µl 10 mM dNTPs und 32 µl 5x Zweitstrang Synthesepuffer in einem Endvolumen von 160 µl. Die Reaktionen wurden für 2 h bei 16°C inkubiert. Zum "blunten" aller cDNA-Enden wurden anschließend 20 U T4 DNA Polymerase zugegeben. Nach einer Phenol-Chloroformextraktion wurde die cDNA durch Zugabe 1/10 Volumens 3 M NaAc pH 4,8 mit 2,5 Volumen Ethanol und 10-15 µg Glykogen bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren der präzipitierten cDNA wurde sie in Wasser resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

5x Erststrang Synthese Puffer: 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH8,3

5x Zweitstrang Synthese Puffer: 100 mM Tris-HCl; 250 mM KCl; 25 mM MgCl₂; pH 8,4

2.2.10 Hefemethoden

2.2.10.1 Hefetransformation mit Hilfe von Lithiumazetat

Eine Einzelkolonie des entsprechenden Hefestamms wurde in 10-50 ml des entsprechenden Mediums (Selektionsmedium bei Hefestämmen die bereits ein Plasmid enthalten, sonst YPD) angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde aus dieser Vorkultur die Hauptkultur (100-300 ml für die Transformation einzelner Plasmide; 1000-1500 ml für die Transformation von Genbanken) auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,2 angesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 wurden die Hefen durch Zentrifugation (1000g, 5 min, RT) geerntet

und mit 1/5 Volumen Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1/10 Volumen 1x TE/LiAc aufgenommen, ca. 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend in einem geringen Volumen 1x TE/LiAc (1,5 ml für Einzeltransformationen, 8 ml für Genbanktransformationen) resuspendiert.

Für jede Transformation wurden 0,1-1 µg Expressionsplasmid bzw. 1 mg Genbank-DNA mit 100 µg Heringssperma-DNA (20 mg für Genbanktransformationen) gemischt. Die Heringssperma-DNA muß zuvor für 15 min bei 95°C denaturiert werden. Zu dem DNA-Mix werden die kompetenten Hefen zugegeben (100 µl) und gemischt. Anschließend wurden 600 µl (60 ml bei Genbanktransformationen) der vorbereiteten PEG/LiAc-Lösung zugegeben und gemischt. Die Zellsuspension wird dann bei 30°C ohne schütteln für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl bzw. 7 ml DMSO (Endkonzentration 10%) wurden die Hefen für 15 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen pelletiert, mit Wasser gewaschen und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien sichtbar.

10x LiAc: 1 M Lithiumazetat, pH7,5; sterilfiltriert
10x TE: 0,1 M Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 7,5; sterilfiltriert
PEG: 50% (w/v) PEG 4000 in Wasser
1x TE/LiAc: je 1/10 Volumen der 10x Stammlösungen von TE und LiAc in Wasser
1x PEG/LiAc: je 1/10 Volumen der 10x Stammlösungen von TE und LiAc in PEG

2.2.10.2 Messung der β-Galaktosidaseaktivität

aus Flüssigkulturen (quantitativ)

Einzelkolonien der entsprechenden Hefestämme wurden über Nacht in 3 ml des entsprechenden Selektionsmediums unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert (10000g, 10 s). Die Hefen wurden in 750 µl Reaktionspuffer resuspendiert und 25 µl Chloroform zugegeben. Nach starkem vortexen wurden die Suspensionen bei 30°C bis zu einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktionen wurden dann mit 400 µl einer 1 M Na₂CO₃-Lösung abgestoppt, zentrifugiert und die Gelbfärbung des klaren Überstandes bei 420 nm gemessen. Gleichzeitig wurde die OD₆₀₀ der verwendeten Kulturen bestimmt und die Enzymaktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase Units} = (1000 \times \text{OD}_{420}) / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

wobei t = Zeit nach Start bis zum Abstoppen der Reaktion (min)

V = eingesetztes Kulturvolumen (ml) entspricht.

100x Mg: 0,1 M MgCl₂; 4,5 M β-Mercaptoethanol
 ONPG: 8 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid in NaPO_i
 NaPO_i: 0,1 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5

Reaktionspuffer: 17,5 ml NaPO_i
 (25 Ansätze) 200 µl 100x Mg
 8 µl 10% SDS
 2,3 ml ONPG

durch "Filterlifts" (qualitativ)

Ein steriler Whatmann-Filter (Ø 75 mm) wurde direkt auf die Hefepatte aufgelegt und leicht angedrückt. Nach Markierung der Orientierung wurde der Filter abgezogen und mit der Kolonieseite nach oben für 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wurden die Filter mit der Kolonieseite nach oben auf einen zweiten Filter aufgelegt, der mit 2-3 ml des Reaktionspuffers getränkt, im Deckel einer Petrischale vorbereitet wurde. Die Filterlifts wurden mit Deckel bei 30°C bis zur Entwicklung einer deutlichen Blaufärbung inkubiert und anschließend unter dem Abzug getrocknet.

100x Mg: 0,1 M MgCl₂; 4,5 M β-Mercaptoethanol
 X-Gal: 20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indosyl-β-Galaktopyranosid)
 in N,N-Dimethylformamid (DMF)
 NaPO_i: 0,1 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5
 Reaktionspuffer: 10 ml NaPO_i
 100 µl 100x Mg
 167 µl X-Gal

2.2.10.3 Gesamtproteinextrakte aus Hefe

Der betreffende Hefestamm wurde in 5 ml Selektionsmedium oder YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen und durch Zentrifugation bei 2500g, 4°C für 10 min geerntet.

Für den Aufschluß wurden die Zellen in Lysispuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde mit vorbehandelten Glasperlen (über Nacht mit HCl gerührt, mit 1 M Tris-HCl pH 7,5 neutralisiert und getrocknet) bis ca. 3 mm unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt. Die Ansätze wurden 3 mal 1 min stark gevortext, und dazwischen 1 min auf Eis inkubiert. Um Zelltrümmer und Glasperlen abzutrennen wurde 10 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 min bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry bestimmt und die Extrakte anschließend mit Probenpuffer versetzt.

Lysispuffer: 200µl 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 120 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0; 60 µl 0,1 M PMSF
 100 µl H₂O; 20 µl Proteaseinhibitoren (je 1 µM Aprotinin, Pepstatin, Leupeptin)
 2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
 2% 2-Mercaptoethanol

2.2.10.4 Isolieren eines Genbankplasmids

Der betreffende Hefestamm wurde in 5 ml Selektionsmedium oder YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen und durch Zentrifugation bei 2500g (4°C, 10 min) geerntet.

Für den Aufschluß wurden die Zellen in Plasmid-Rescue-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde mit vorbehandelten Glasperlen bis ca. 3 mm unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt und 200 µl PCI zugesetzt. Die Ansätze wurden 3 mal 1 min stark gevortext, und dazwischen 1 min auf Eis inkubiert. Um Zelltrümmer und Glasperlen abzutrennen wurde 10 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 min bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Nach anschließender Chloroformextraktion wurde die in der wässrigen Lösung enthaltene DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol bei -20°C gefällt. Die so erhaltene DNA wurde in KC8 Bakterien elektroporiert, und die einzelnen Plasmide anschließend nach Aminosäureselektion aus den KC8 Bakterien isoliert. Für die Isolierung des Genbankplasmids wurden die KC8 Bakterien auf Agarplatten ohne Leucin, für das Angelprotein auf Platten ohne Tryptophan selektioniert.

Plasmid-Rescue-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 2% Triton-X100 1% SDS
PCI:	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)

2.2.11 Messung der Firefly- und Renillaluziferaseaktivität

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

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

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

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

3 Ergebnisse

Der Glukokortikoidrezeptor ist in der Lage die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B zu reprimieren, was vermutlich die molekulare Grundlage der antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden bildet. Die AP-1 Repression wird durch eine Protein-Interaktion des GR vermittelt. *In vitro* Daten lassen auf eine direkte Interaktion mit AP-1 schließen. Weitere experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß die direkte Interaktion (sofern sie in der Zelle *in vivo* stattfindet) zwischen GR und AP-1 nicht ausreichend ist, sondern daß vermutlich weitere Proteine an dem Prozeß der Transrepression beteiligt sind.

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems können bisher noch unbekannte Interaktionspartner des GR identifiziert werden. Die Isolate sollen anschließend im Zellkultursystem auf ihre Beteiligung am Transrepressionsprozeß von AP-1 untersucht werden. Für die erfolgreiche Durchführung eines Two-Hybrid Screens muß zunächst eine geeignete Rezeptormutante hergestellt werden, die selbst keine Transaktivierungskapazität mehr besitzt, aber in ihren Repressionseigenschaften nicht beeinträchtigt ist. Eine solche Mutante trägt eine Punktmutation in der Helix 12 der Ligandenbindedomäne.

3.1 Charakterisierung der verwendeten Glukokortikoidrezeptormutanten hinsichtlich ihrer Transaktivierungs- und Repressionseigenschaften

Der Two-Hybrid Screen erfordert die Verwendung von GR-Mutanten, die in Abb. 3 schematisch dargestellt sind. In Abb. 3A ist der Wildtyprezeptor dargestellt, in den Teilen B,C und D die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten.

Die Ligandenbindung an GR führt zu einer Reihe von intramolekularen Umlagerungen, wodurch neue Proteinoberflächen für die Koaktivatorbindung entstehen. Wichtig hierbei ist das Zurückklappen der Helix 12 auf die Helix 3. Im Zentralbereich der Helix 12 befindet sich die Aminosäure Glutaminsäure, die für die Repositionierung durch Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen der Helix 12 und der Helix 3 wichtig ist.

In der GR-Mutante Helix 12 (GR_{mH12}) ist diese Aminosäure gegen Glutamin ausgetauscht. Es wird erwartet, daß die intramolekulare Umlagerung nach Ligandenbindung bei dieser Mutante

nicht mehr stattfindet und Koaktivatoren der AF-2 nicht mehr interagieren können (Renaud et al., 1995). Aus diesem Grund sollte diese Mutante in ihrer Transaktivierungsfähigkeit deutlich reduziert sein.

Bei einer weiteren Mutante ($GR_{mH12\Delta AF-1}$, Abb. 3C) wurde zusätzlich zur Punktmutation in der Helix 12 die ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion AF-1 entfernt.

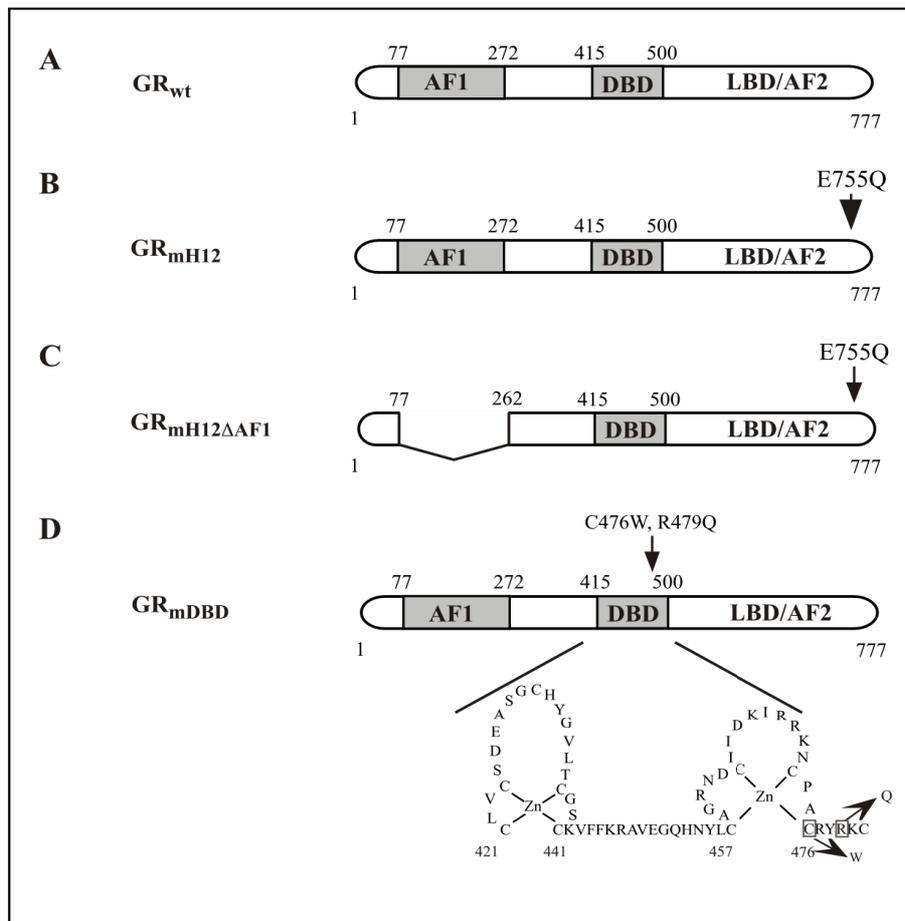


Abb. 3: Schematische Darstellung der verwendeten Glukokortikoidrezeptormutanten.

A) Aufbau des Wildtyp-GR Glukokortikoidrezeptor (wt). Er enthält eine ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-1) im N-Terminus, eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Ligandenbindedomäne (LBD) die mit der ligandenabhängigen Transaktivierungsfunktion (AF-2) überlappt. Die Ziffern stehen für die jeweiligen Aminosäurepositionen. **B)** GR_{mH12} enthält eine Punktmutation in der Helix 12 (Position 755) wobei Glutamat (E) gegen Glutamin (Q) ausgetauscht wurde. **C)** $GR_{mH12\Delta AF1}$ enthält zusätzlich zur Punktmutation in der Helix12 eine komplette Deletion der AF-1. **D)** GR_{mDDB} trägt eine Mutation in einem der Zink-bindenden Cysteinreste im zweiten Zinkfinger der DBD (C476W) sowie eine weitere Punktmutation innerhalb der DBD (R479Q).

Nachfolgend sollte geklärt werden, wie sich die einzelnen Mutanten bezüglich Transaktivierung und Transrepression verhalten (Abb. 4).

Die Transaktivierung von Genen durch den GR kann in Zellkulturen durch die Verwendung eines geeigneten Reportergenplasmids analysiert werden. Dieses Luziferasereporter gen enthält einen Teil des *Maus Mamma Tumor Virus* (MMTV)-Promotors, der klassische GREs trägt und durch GR-Homodimere aktiviert wird. Nach Hormonzugabe in GR exprimierenden Zellen läßt sich somit eine gesteigerte Reporter genaktivität messen.

Zur Analyse der Transaktivierung wurde das MMTV-Reporter genplasmid pHC_{wt}-Luziferase zusammen mit den entsprechenden Rezeptorkonstrukten in rezeptorlose Cos7-Zellen transient transfiziert. Da diese Zellen keinen endogenen GR enthalten, können die Effekte der eingesetzten Mutanten gezielt analysiert werden (Abb. 4A). In Zellkulturen wurde Dexamethason als Ligand des GR verwendet.

Der Wildtyp GR ist im Vergleich zur Leervektorkontrolle in der Lage die Expression des Reporter gens ca. 25-fach zu induzieren. Die Helix 12-Mutante zeigt eine wesentlich schwächere Aktivierung des Reporter gens (8-fach). Diese Restaktivität wird vermutlich durch die ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion AF-1 vermittelt. Um eine Rezeptormutante zu erhalten die keine Transaktivierung mehr zeigt, wurde zusätzlich zur Punktmutation in der Helix 12 die ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion AF-1 entfernt (GR_{mH12ΔAF-1}) (Abb. 3C)

Diese Mutante zeigte im verwendeten Zellkultursystem keine Transaktivierung mehr (Abb. 4A).

Um eventuelle Unterschiede in der Transfektionseffizienz bei den einzelnen Ansätzen auszugleichen, wurde hier und bei allen weiteren transienten Transfektionen zu jedem Ansatz 0,1 µg eines Expressionsplasmids für Renilla-Luziferase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors (Ubiquitin C) zugegeben. Die Aktivität des Ubiquitinpromotors wird durch die verschiedenen Behandlungen der Zellen (z.B. TPA oder Dex) nicht beeinflusst. Die gemessenen Firefly-Luziferaseaktivitäten wurden durch die Renilla-Luziferaseaktivität derselben Transfektion dividiert und somit normalisiert.

Die AP-1 Repression durch den GR läßt sich mit Hilfe eines AP-1 abhängigen Reportergens nach TPA Induktion bestimmen. In diesem Reporter kontrolliert ein Teil des menschlichen KollagenaseI Promotors (Position -517 bis +63) die Expression der Firefly-Luziferase und läßt sich durch den Phorbolster TPA induzieren.

Durch die Aktivierung des GR mit Dexamethason läßt sich die TPA-induzierte Reportergenaktivität reprimieren. Die Luziferaseaktivität im reprimierten Zustand wurde durch die Luziferaseaktivität nach TPA-Induktion dividiert. Diese Reduktion der Reporteraktivität ist ein Maß für die Repressionskapazität des GR bzw. der eingesetzten GR-Mutanten.

Bei Verwendung des Wildtyprezeptor geht die Reporteraktivität auf ca. 25% Restaktivität zurück (Abb. 4B). Die Helix12-Mutante, sowie die zusätzlich AF-1 deletierte-Mutante sind noch immer in der Lage das Reportergen zu reprimieren (Rückgang auf ca. 35-40%).

Die Helix12-Mutante (GR_{mH12}) ist demnach eine Mutante die AP-1 noch effizient reprimieren kann. Das gleiche gilt für die zusätzlich AF-1 deletierte Mutante (GR_{mH12ΔAF-1}), die aber zusätzlich keine Transaktivierungseigenschaften mehr besitzt.

Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz der Mutante GR_{mH12ΔAF-1} in einem Two-Hybrid Screen. Da die Mutante noch reprimieren kann, wird erwartet, daß die für AP-1 Repression erforderlichen zusätzlichen Faktoren als Interaktionspartner im Two-Hybrid Screen identifiziert werden können.

Für die spätere funktionelle Charakterisierung der Two-Hybrid Isolate wurde eine GR-Mutante (GR_{mDBD}) verwendet, die *in vitro* keine Repression zeigt.

Der GR_{mDBD} trägt im zweiten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne und außerhalb der Zinkfingerregion der DBD zwei Punktmutationen. Diese sind schematisch in der Abb. 3D dargestellt. Diese Mutante zeigt keine Transaktivierung und keine Transrepression mehr (Abb. 4A und B), obwohl sie noch mit AP-1 *in vitro* interagieren kann (Göttlicher et al., 1996). Dies führte zu der Hypothese, daß die Interaktion des GR mit AP-1 für die Vermittlung der Transrepression nicht ausreicht und weitere Faktoren an der Transrepression beteiligt sind, die von der DBD-Mutante nicht gebunden werden können. Die GR_{mDBD} wird im Abschnitt 3.5 noch genauer beschrieben.

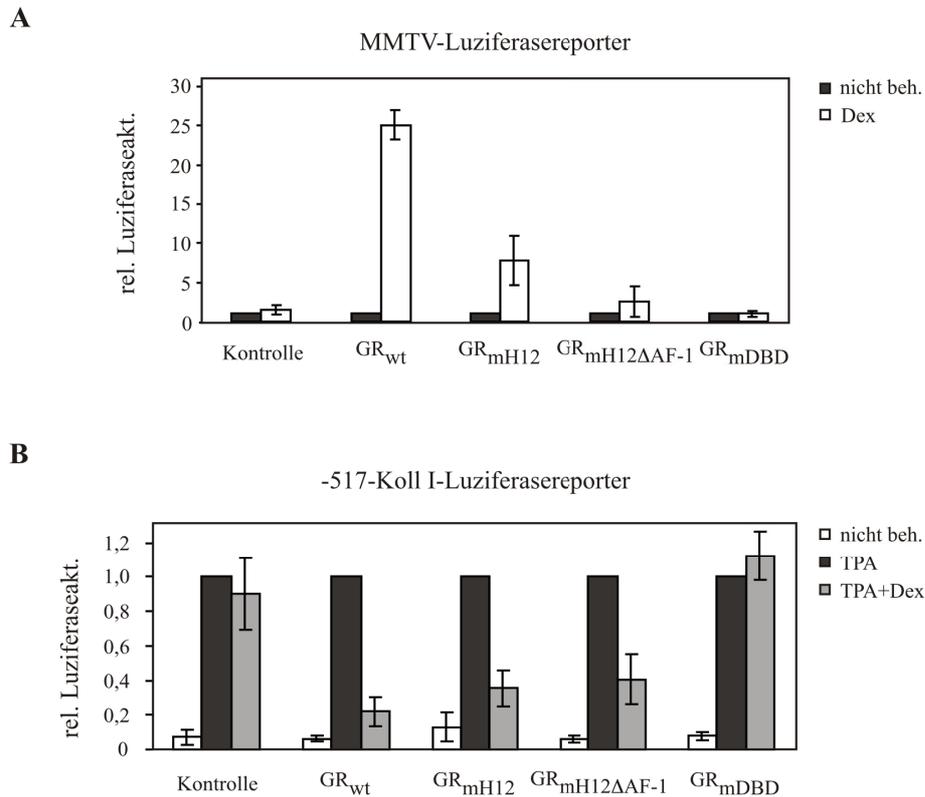


Abb. 4: Transaktivierung und Transrepression der verwendeten Glukokortikoidrezeptor-mutanten in Cos7-Zellen.

(A) Transaktivierung: $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende Cos7-Zellen wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphatpräzipitation mit jeweils $1 \mu\text{g}$ eines pHC_{wt}-Luziferasereporters und des entsprechenden GR-Expressionsplasmids transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 16 h mit 10^{-7}M Dexamethason (weiß) oder nicht behandelt (schwarz). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (prSH-) zusammen mit dem Reporter gen transfiziert und auf die gleiche Weise behandelt. Die relative Luziferaseaktivität ergibt sich aus dem Verhältnis der in Anwesenheit und in Abwesenheit des Hormons gemessenen Luziferaseaktivitäten. Alle Luziferaseaktivitäten wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert. **(B) Transrepression:** $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende Cos7-Zellen wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphatpräzipitation mit jeweils $1 \mu\text{g}$ eines -517-Koll I-Luziferasereporters und des entsprechenden Glukokortikoidrezeptorkonstruktes transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 16 h mit 60 ng/ml TPA (schwarz), mit 60 ng/ml TPA und 10^{-7}M Dexamethason gleichzeitig behandelt (grau) oder nicht behandelt (weiß). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (prSH-) zusammen mit dem Reporter gen transfiziert und auf die gleiche Weise behandelt. Die relative Luziferaseaktivität ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Luziferaseaktivität nach TPA mit Hormon bzw. ohne Behandlung und der Luziferaseaktivität nach TPA Induktion. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung sind als Balkendiagramm in A und B dargestellt.

3.2 Funktionelle Expression des Glukokortikoidrezeptors in Hefe

Bevor ein Two-Hybrid Screen mit dem GR_{mH12ΔAF-1} durchgeführt werden konnte, mußte zuerst geklärt werden ob sich der GR in Hefe funktionell exprimieren und durch seinen Ligand aktivieren läßt. Hierzu wurde der Hefestamm Y187CU mit einem β-Galaktosidasereporter gen transformiert, der unter der Kontrolle eines Glukokortikoid responsiven Elements (GRE) steht. Dexamethason zeigte sich in Hefezellen als ungeeigneter Ligand für den GR, da es von den Zellen vermutlich nicht aufgenommen wird. Aus diesem Grund wurde in Hefe Triamcinolonazetonid (TAC) eingesetzt, ein anderes synthetisches Glukokortikoid.

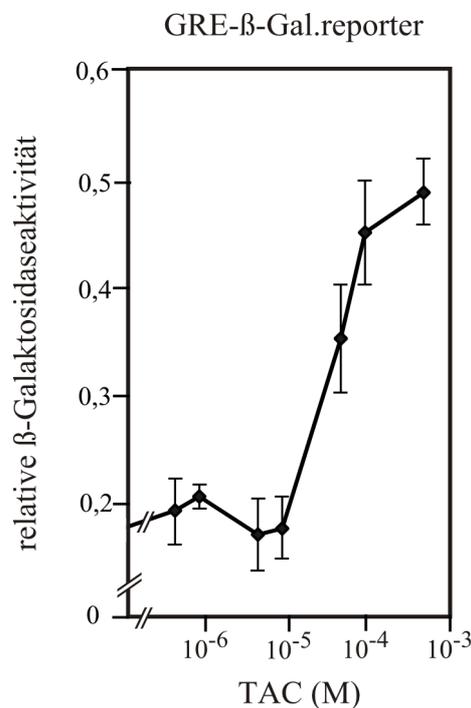


Abb. 5: Der Glukokortikoidrezeptor läßt sich in Hefe funktionell exprimieren.

Der Hefestamm Y187CU wurde mit jeweils 0,5 µg eines GRE-haltigen β-Galaktosidase-Reporters und eines Expressionsplasmids kodierend für GR_{wt} transformiert. Die Reporter genaktivität nach verschiedenen Mengen des Hormons TAC wurde mit Hilfe eines β-Galaktosidasetests nach 16 h aus Suspensionskulturen bestimmt. Aufgetragen wurde die β-Galaktosidaseaktivität (Units) aus Mittelwerten dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung.

Die Abb. 5 zeigt die TAC-Dosisabhängigkeit der Reporteraktivierung durch den GR in Hefe. Die maximale Aktivierung liegt zwischen 10^{-4} und 10^{-3} M TAC, wobei Konzentrationen über 10^{-3} M bereits eine deutliche Toxizität für die Hefen hervorriefen (schlechtes Wachstum, Verklumpen). Für alle weiteren Experimente in Hefe wurden daher 10^{-4} M TAC verwendet. Der GR ist somit auch in Hefe als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor exprimierbar. Aus diesem Grund ist es möglich nach interagierenden Proteinen des GR in Hefe mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens zu suchen.

3.3 Die Glukokortikoidrezeptormutante GR_{mH12ΔAF-1} ist eine geeignete Mutante für die Suche nach neuen Partnerproteinen des GR, die an der Repression beteiligt sind

Für die Suche nach interagierenden Proteinen des GR mit Hilfe des Two-Hybrid Screens, wurde die GR-Mutante GR_{mH12ΔAF-1} mit der Gal4-DBD fusioniert. Das Plasmid kodiert zusätzlich für ein Schlüsselenzym der Tryptophansynthese, dessen Expression als Auxotrophiemarker benutzt werden kann (Abb. 6A).

GR_{mH12ΔAF-1} konnte in Cos7-Zellen nicht mehr transaktivieren, und zeigte auch als Gal_{DBD}-Fusionsprotein (GAL_{DBD}-GR_{mH12ΔAF-1}) im Hefestamm Y190 keine selbständige Aktivierung des Reportergens nach Hormonzugabe, im Gegensatz zu einem vergleichbaren, die Wildtyp-GR Sequenz enthaltenden Gal-Fusionsprotein (GAL_{DBD}-GR_{wt}) (Abb. 6B).

Aus diesem Grund kann die Gal4-Fusion der Mutante als "Angel" für den Two-Hybrid Screen verwendet werden. Die Repressionskapazität der Mutante ist in Säugetierzellen nicht beeinträchtigt. Deshalb ist zu erwarten, daß noch unbekannte Kofaktoren des GR, die für die AP-1 Repression benötigt werden, durch den Two-Hybrid Screen identifiziert werden können. Da die Mutante in Säugetierzellen nicht mehr transaktivieren kann, sollte sie keine Interaktion mit Koaktivatoren zeigen. Diese Annahme wurde für einen bekannten Koaktivator des GR, TIF1 durch eine Two-Hybrid Analyse überprüft. TIF1 kann nicht mehr mit der Mutante interagieren. Diese Analyse erfolgte semi-quantitativ mit Hilfe von "Filterlifts" (Daten nicht gezeigt).

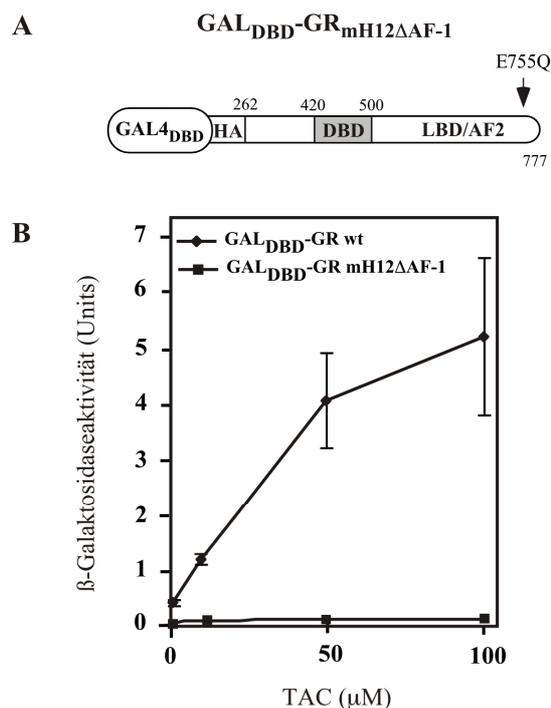


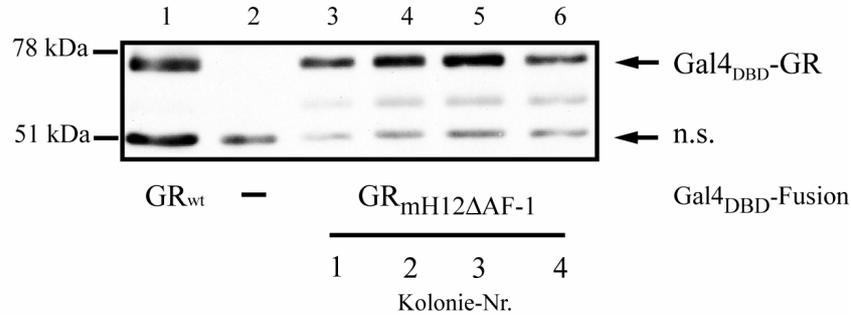
Abb. 6: Schematische Darstellung des verwendeten Two-Hybridkonstrukts und seine Transaktivierungskapazität nach Hormonzugabe.

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Two-Hybridkonstrukts. Das Fusionsprotein besteht aus der Gal4_{DBD} und GR_{mH12ΔAF-1} ab der Aminosäure 262 bis 777. Die DNA-Bindedomäne (DBD) und die Liganden-bindedomäne (LBD) mit enthaltener Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) sind zusätzlich markiert. Das Fusionsprotein trägt zusätzlich ein Epitop des Hämagglutinin aus *Hämophilus influenzae* (HA). (B) Der Hefestamm Y190 wurde mit jeweils 1,0 μg eines Expressionsplasmids kodierend für Gal4_{DBD}-GR_{wt} bzw. für Gal4_{DBD}-GR_{mH12ΔAF-1} transformiert. Die Reporterogenaktivität nach verschiedenen Mengen des Hormons TAC wurde mit Hilfe eines β-Galaktosidasetests aus Suspensionskulturen bestimmt. Aufgetragen wurde die β-Galaktosidaseaktivität (Units) aus Mittelwerten dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung.

Die Expression des Fusionsproteins in den verwendeten Hefestämmen Y190 und Y187, wurde mit Hilfe der Western-Blotanalyse überprüft. Hierzu wurden Proteinextrakte aus drei unabhängigen Kolonien des GR_{mH12ΔAF-1} transformierten Hefestamm Y190 hergestellt (Spur 3,4 und 5) und einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen (Abb. 7A). Als Kontrollen wurden Extrakte von GR_{wt} enthaltenden Hefen (Spur 2) und nicht-transformierten Hefen aufgetragen (Spur 1). Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 12CA5, der das HA-Epitop erkennt. Der Pfeil markiert die Größe der

jeweils verwendeten Glukokortikoidrezeptoren. Der GR_{mH12ΔAF-1} wird in allen getesteten Kolonien exprimiert. Für den nachfolgenden Two-Hybrid Screen wurde die Kolonie 3 verwendet.

A in Y190



B in Y187

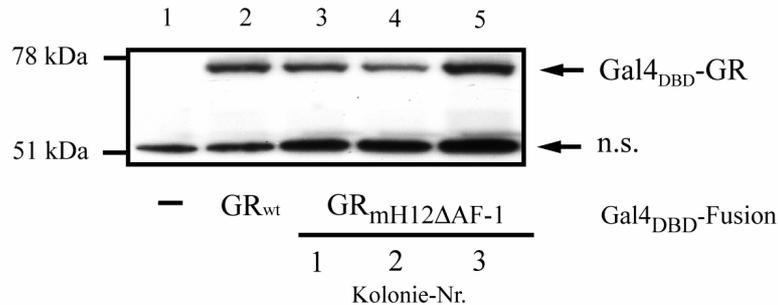


Abb. 7: Das Gal4-GR_{mH12ΔAF-1} Fusionsprotein wird in Y190 und in Y187 exprimiert.

(A) Der Hefestamm Y190 wurde mit jeweils 1,0 µg eines Expressionsplasmids kodierend für Gal_{DBD} (-), Gal_{DBD}-GR_{wt} bzw. Gal_{DBD}-GR_{mH12ΔAF-1} transformiert und Gesamtzellextrakte von z.T. mehreren Klonen hergestellt. Jeweils 50 µg der Proteinextrakte wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das jeweilige Fusionsprotein durch Western-Blotanalyse mit Hilfe des HA-Antikörpers detektiert. (B) Der Hefestamm Y187 wurde mit jeweils 1,0 µg eines Expressionsplasmids kodierend für Gal_{DBD} (-), Gal_{DBD}-GR_{wt} bzw. Gal_{DBD}-GR_{mH12ΔAF-1} transformiert. Die Detektion erfolgte wie in (A) beschrieben.

n.s.: nicht spezifisch

Abb. 7B zeigt die Expression des Fusionsproteins im Hefestamm Y187, der zu einem späteren Zeitpunkt des Two-Hybrid Screens verwendet wird (siehe Abschnitt 3.4.3). Proteinextrakte aus vier unabhängigen Kolonien von GR_{mH12ΔAF-1} transformiertem Hefestamm Y187 wurden hergestellt (Spuren 3,4,5 und 6) und einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

unterworfen. Als Kontrollen wurden Extrakte von GR_{wt} enthaltenden Hefen (Spur 1) und nicht-transformierten Hefen aufgetragen (Spur 2). Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte ebenfalls durch den monoklonalen Antikörper 12CA5. Der Pfeil markiert die Größe der jeweils verwendeten Glukokortikoidrezeptoren. Die GR-Mutanten wurden in allen vier Klonen exprimiert.

3.4 Durchführung eines Two-Hybrid Screens zur Identifikation neuer Partnerproteine des GR, die an der Transrepression beteiligt sind

Mit der Gal-GR_{mH12ΔAF-1} exprimierenden Kolonie 3 aus Abb. 7A wurde ein Two-Hybrid Screen in dem dualen Reporterstamm Y190 durchgeführt. Wird das GR_{mH12ΔAF-1} Konstrukt im Stamm Y190 exprimiert, so läßt sich durch Zugabe von 25 mM 3' Aminotriazol (3'AT) die Aktivität des durch die hohe Basalaktivität des Reporters entstandenen HIS3-Genproduktes inhibieren.

Durch den Two-Hybrid Screen sollten neue Partnerproteine des hormonbeladenen GR identifiziert werden. Daher wurde der Screen in Anwesenheit von 100 µM Triamcinolonacetonid durchgeführt. Die Abb. 8 zeigt ein Flußdiagramm der einzelnen Schritte des Screens.

3.4.1 Genbank und Hefetransformation

Als Genbank wurde die kommerzielle humane HeLa MATCHMAKER™ cDNA-Genbank verwendet mit 6·10⁶ unabhängigen Klonen und einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1,5 kb (0,4-2,0 kb), die als Selektionsmarker ein Schlüsselenzym zur Leucinbiosynthese kodiert. Die MATCHMAKER-Genbank (in DH10B) wurde expandiert und die daraus gewonnene DNA in den GR_{mH12ΔAF-1}-Stamm von Y190 transformiert.

Um sicherzustellen, daß die gesamte Genbank im durchgeführten Two-Hybrid Screen repräsentiert wurde, ist es wichtig eine ausreichend hohe Anzahl primärer Transformanten nach der Genbanktransformation zu erhalten. Hierbei gilt folgende Faustregel:

Eine HeLa Zelle enthält ca. 1 pg mRNA (entspricht 10⁶ Moleküle mRNA) die von 15000 individuellen Genen transkribiert wurde. Um alle Genprodukte nach der Transformation zu repräsentieren, müssen mindestens 45000 unabhängige Transformanten erhalten werden, die für alle Transkripte der 15000 Gene in 3 möglichen Leserahmen kodieren. Um auch schwächer exprimierte Gene zu erhalten, wird diese Zahl noch mit dem Faktor 10-100 multipliziert. Die nach

der Genbanktransformation erhaltenen $2,5 \cdot 10^6$ primären Transformanten sind demnach ausreichend, um die Genbank zu repräsentieren.

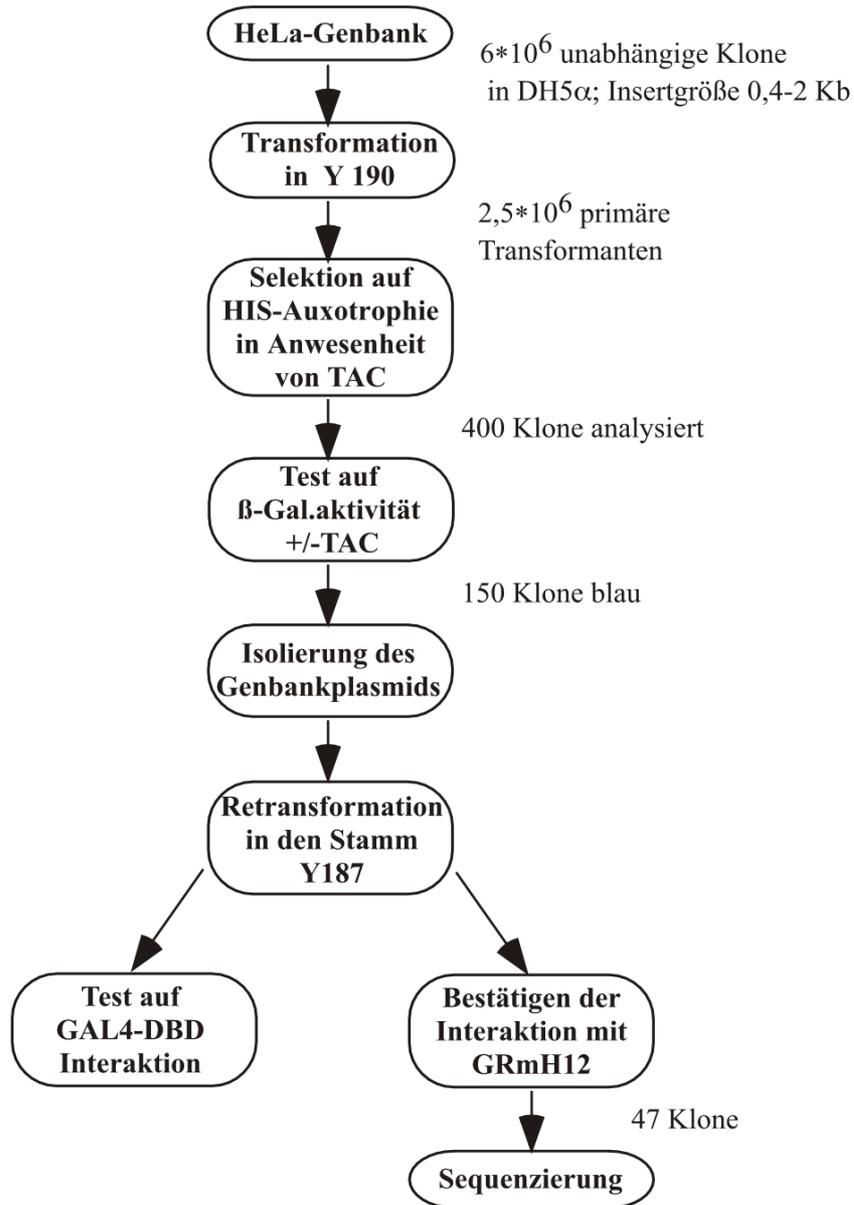


Abb. 8: Flußdiagramm des durchgeführten Two-Hybrid Screens.

In dem Flußdiagramm sind die einzelnen Schritte des Two-Hybrid Screens für interagierende Proteine der GR-Mutante mH12 Δ AF-1 dargestellt. Die Angaben auf der rechten Seite der Abbildung beziehen sich auf die Anzahl der bei den einzelnen Schritten analysierten Klone. TAC: Triamcinolonazetonid

Die primären Transformanten wurden auf Selektionsplatten ohne Histidin, Leucin (Auxotrohiemarker des Genbankplasmids) und Tryptophan (Auxotrohiemarker des „Angel“-Plasmids) mit 25 mM 3'AT und 100 µM Triamcinolonacetonid ausplattiert. Nach vier bis sieben Tagen wurden die sichtbaren Klone gepickt (400 Klone) und zweimal auf Selektionsplatten durch Ausstreichen auf Einzelkolonien gereinigt. Hierdurch werden Kolonien eliminiert, die sich von den Histidinvorräten der durch die Selektion abgestorbenen Hefen ernähren, aber das HIS3-Reporter gen nicht aktivieren konnten. Zusätzlich können bei der Transformation zwei Genbankplasmide aufgenommen werden und durch den anschließenden Verlust eines Plasmides zu inhomogenen Kolonien führen. Dies wird bei der Aufreinigung über Einzelkolonien verhindert.

3.4.2 Test des zweiten Reporters *LacZ*

Alle Kolonien wurden bereits auf die Aktivität des ersten Reportergens vorselektioniert (Histidinprototrophie), und mußten anschließend auf die Aktivität des zweiten Reporters überprüft werden. Da die beiden Reporter unterschiedliche Promotorkontexte enthalten, lassen sich bei diesem Schritt bereits viele „falsch positive Klone“ eliminieren.

Die 400 Klone wurden zur Überprüfung des zweiten Reportergens β -Galaktosidase auf Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und in An- oder Abwesenheit des Hormons TAC auf β -Galaktosidaseaktivität im „Filterlift“ getestet. 150 der 400 getesteten Kolonien zeigten eine deutlich sichtbare Blaufärbung.

3.4.3 Isolierung des Genbankplasmids und Retransformation

Die Genbankplasmide dieser 150 Klone wurden isoliert und zusammen mit GR_{mH12 Δ AF-1} in Y187 transformiert. Der Stamm Y187 ist kein dualer Reporterstamm, er enthält also nur das β -Galaktosidase-Reporter gen. Durch diese Retransformation in einen unabhängigen Hefestamm muß sich die bereits beobachtete Interaktion des Genprodukts mit GR_{mH12 Δ AF-1} nochmals bestätigen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Reporteraktivitäten in Y190 nicht durch eine Mutation des Gal4-DBD Konstruktes oder des Hefestamms erfolgten.

Gleichzeitig wurden die Genbankplasmide der 150 Klone zusammen mit einem Plasmid, kodierend für die Gal4-DNA-Bindedomäne, retransformiert um eine nicht-GR-spezifische

Interaktion auszuschließen. Die Expression des Fusionsproten in dem Stamm Y187 konnte mit Hilfe einer Western-Blotanalyse gezeigt werden (Abb. 7B).

Nachdem sich die Interaktion von 47 Genprodukten mit GR_{mH12ΔAF-1} in dem Hefestamm Y187 bestätigen ließ, wurden die zugehörigen Genbankplasmide sequenziert. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit Hilfe des "Advance Blast 2.0"-Programms über den WWW-Zugang im "National Center for Biotechnology and Information *NCBI* " analysiert. Bereits bekannte Proteine wurden anhand der Datenbankeintragungen identifiziert.

Eine Zusammenfassung der Sequenzanalysen der einzelnen positiven Klone findet sich in Tabelle 1.

Klon	Sequenzhomologie	Acc. Nummer	Bemerkungen
1	Ribosomales Protein S8		
2	Humane XE169 mRNA	L25270	
3	EST-Klon (RP5-991C6)	AL078599	
4	Ribosomales Protein S18	X69150	
6	Cytochrom Oxidase II (Hsa3)	U12691	nicht im richtigen Leseraster
10	β-Tubulin	X02344	nicht im richtigen Leseraster
11	β-Glukosidase	J03077	nichtkodierende 3' Sequenz
12	Pohibitin	S85655	nicht im richtigen Leseraster
13	Mikrosomale Peptidase (SPC18)	J05466	
16	HHR23	D21235	nicht im richtigen Leseraster
17	Wnt-13	Z71621	nichtkodierende 5' Sequenz
18	EST-Klon (DKFZp566O1646)	AL050084	
19	Cytochrom C Oxidase II	X55654	nicht im richtigen Leseraster
22	Ribosomales Protein L37	D23661	
24	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 204
25	HMG2B	Z17240	nicht im richtigen Leseraster
27	unbekannt		
28	Cytochrom C Oxidase IV	M21575	antisense Orientierung
31	unbekannt		
34	Inosin Monophosphat DH	J04208	nicht im richtigen Leseraster

Fortsetzung Tabelle 1

39	Proteasomenuntereinheit hPI31	D88378	
40	KIAA0026	D14812	nicht im richtigen Leseraster
42	H+ATP Synthase Untereinheit B	X60221	antisense Orientierung
43	unbekannt		
62	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 196
72	RHAMM	U29343	nicht im richtigen Leseraster
76	LLRep3	X17206	antisense Orientierung
106	Unbekannt, Homologie zu Kollagen $\alpha 6$ (IV)	(U04845)	nur 100 Basen homologe Sequenz
116	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 218
129	DNA abh. Proteinkinase	U47077	nicht im richtigen Leseraster
147	HoxA10		
148	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 196
154	GU/RH II bindendes Protein	U78524	
155	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 282
175	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 200
179	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 219
185	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 206
192	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 218
196	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 225
198	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 190
199	GAPDH		
213	Ubc9	U29092	Göttlicher et al., 1996
215	Paraoxonase	L48513	nicht im richtigen Leseraster
216	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 219
218	CGI-117	AF151875	C. elegans homologes Protein
224	Trip6	AJ001902	ab Aminosäure 251
227	Ribosomales Protein S26		

Tab.1: Sequenzanalysen der positiven Klone

Die Nummerierung der 400 gepickten Klone wurde bis zum Schluß beibehalten. Die Datenbanknummern (Acc. Nummer, Spalte 3) wurden, soweit bekannt, angegeben.

Die im richtigen Leserahmen kodierten Genprodukte wurden anhand der Hormonabhängigkeit und der Stärke der Interaktion mit GR in verschiedene Gruppen eingeteilt. Hierzu wurde das Verhältnis der β -Galaktosidaseaktivitäten in Anwesenheit und Abwesenheit des Hormons Triamcinolonacetonid aus Suspensionskulturen bestimmt. Dadurch läßt sich zwischen hormonunabhängig (Spalte zwei), leicht, und stark hormonabhängig interagierenden Proteinen (Spalte drei und vier) unterscheiden. Die Isolate der Spalte eins zeigten eine stärkere Interaktion in Abwesenheit als in Anwesenheit des Hormons. Da AP-1 Repression eine hormonabhängige Funktion des GR ist, kommen für die weitere Bearbeitung nur hormonabhängige Isolate in Frage.

	Hormonabh. <1	Hormonabh. <3	Hormonabh. >3	Hormonabh. >10
schwache Interaktion (β -Gal.aktivität <2 Units)	Rib. Protein S26	Rib. Protein S8; S18; L28; L37 unbek. Klone #18 und #106	Mikrosom. Peptidase Proteasomen-untereinheit hPI31 GU/RH II-bind. Protein Trip6 unbek. Klone #27 und #31	Trip6
starke Interaktion (β -Gal.aktivität >2 Units)		unbek. Klon #43 CGI-117	Trip6	Ubc9

Tab.2: Stärke und Hormonabhängigkeit der einzelnen Interaktionen

Die Isolate wurden nach Stärke und Hormonabhängigkeit der Interaktion in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Hormonabhängigkeit (Hormonabh.) ergibt sich aus dem Verhältnis der gemessenen β -Galaktosidaseaktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von Hormon.

Rib. Protein: Ribosomales Protein; unbek.: unbekannt; Mikrosom. Peptidase: Mikrosomale Peptidase; GU/RH II-bind. Protein: GU/RH II-bindendes Protein

Einige Klone kodieren für bisher noch unbekannte Proteine; für sie konnte keine Sequenzhomologie in der Datenbank gefunden werden. Um zu überprüfen, ob dennoch ein Protein durch die unbekannte Sequenz kodiert wird, wurde die Expression der interagierenden Proteine aus verschiedenen Klonen mit Hilfe der Western-Blotanalyse unter Verwendung eines Gal4-TAD-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 9). Als Kontrollen wurden Extrakte von nicht-transformierten Y190 (-) bzw. eines nur die Gal4TAD enthaltenden Hefestammes (+) aufgetragen. Die Klone 3, 27, 106, 129 und 218 enthalten bisher noch unbekannte Sequenzen, exprimierten jedoch ein Gal-Fusionsprotein. Die Klone 18 und 72 zeigen ein Signal, das der Größe der Gal TAD entspricht (+). Die dennoch beobachtete Interaktion mit GR_{mH12ΔAF-1} in diesen Kolonien kann nur durch die unspezifische Bindung eines sehr kurzen Peptids erklärt werden. Die Klone 147 (HoxA10), 154 (GU/RH II-bindendes Protein), 155 und 175 (beide Trip6) sowie 213 (Ubc9) wurden mit Hilfe des Datenbankvergleichs als bekannte Proteine identifiziert, wurden im richtigen Leserahmen kodiert und zeigten die Expression der Gal-TAD-Fusionsproteine in der erwarteten Größe. Die bei vielen Klonen auftretenden kleineren Banden sind vermutlich Degradationsprodukte, die während der Extraktpräparation entstanden sind.

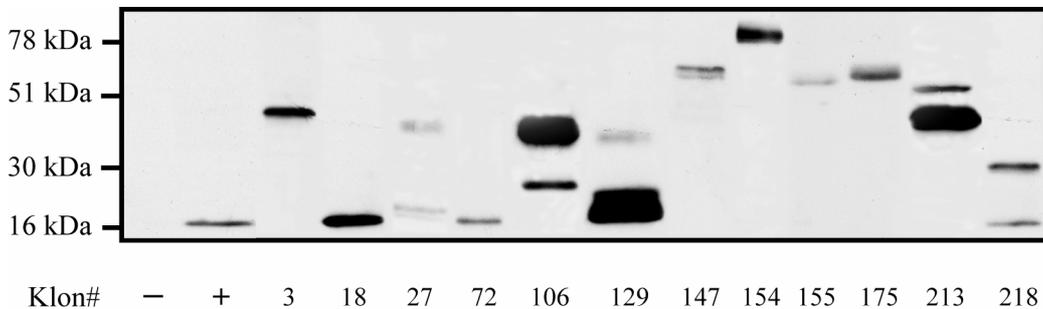


Abb. 9: Western-Blot verschiedener interagierender Proteine.

Von den jeweiligen Two-Hybridklonen (bezeichnet mit der zugehörigen Nummer) wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Jeweils 50 µg der Proteinextrakte wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das jeweilige Fusionsprotein durch Western-Blotanalyse mit Hilfe eines Gal4_{TAD}-Antikörpers detektiert. Als Kontrollen wurden Extrakte von nicht-transformierten Y190 (-) bzw. eines nur die Gal4_{TAD} enthaltenden Hefestammes (+) aufgetragen.

Klon#: Klonnummer

Hefestamm Y190 hergestellt (Spuren 3 und 4) und einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen. Als Kontrollen wurden Extrakte von GR_{wt} enthaltenden Hefen (Spur 1) und nicht-transformierten Hefen aufgetragen (Spur 2). Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 12CA5, der das HA-Epitop erkennt. Der Pfeil markiert die Größe der jeweils verwendeten Glukokortikoidrezeptoren. Die GR-Mutante wurde in beiden Klonen exprimiert.

Zur Überprüfung der Interaktion zwischen den Genbankisolaten und der DBD-Mutante wurden die jeweiligen Genbankplasmide zusammen mit GR_{mDBD}, und als Vergleich zusammen mit GR_{mH12 Δ AF-1}, in den Hefestamm Y190 transformiert. Die Interaktionsstärke wurde durch einen β -Galaktosidasetest aus den Suspensionskulturen quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (nur TAD) zusammen mit GR_{mH12 Δ AF-1} bzw. GR_{mDBD} transformiert und mit Hormon behandelt oder nicht behandelt.

Mit Hilfe der Interaktion mit der Mutante GR_{mDBD} lassen sich die getesteten Isolate in drei Gruppen einteilen:

1. Proteine, die mit GR_{mH12 Δ AF-1} sehr stark hormonabhängig interagieren, aber mit GR_{mDBD} nicht oder nur sehr schwach hormonunabhängig interagieren, z.B. Trip6 und das GU-bindende Protein.
2. Proteine, die mit GR_{mH12 Δ AF-1} schwach hormonabhängig interagieren, aber mit GR_{mDBD} besser oder hormonunabhängig interagieren, z.B. die mikrosomale Peptidase und der bisher unbekannte Klon#3.
3. Proteine, die mit beiden Mutanten deutlich hormonabhängig interagieren, z.B. HoxA10 und Ubc9. Diese Isolate zeigen deutlich, daß die DBD-Mutante auch hormonabhängig mit verschiedenen Proteinen interagieren kann und somit in Hefe funktionell exprimiert wird.

Die Proteine der ersten Gruppe sind die potentiell interessanten Kandidaten für neue Partnerproteine, die an der Repression beteiligt sein könnten.

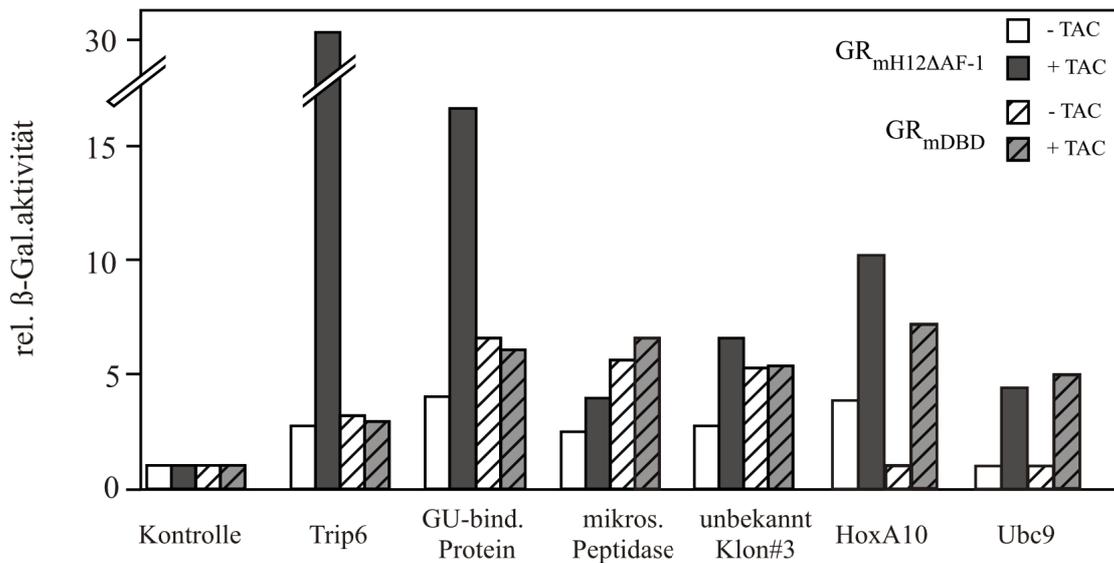


Abb. 11: Die verschiedenen Isolate werden auf eine potentielle Interaktion mit GR_{mDDB} getestet.

Der Hefestamm Y190 wurde mit jeweils 1,0 µg eines Expressionsplasmids kodierend für Gal4_{DBD}-GR_{mDDB} und des entsprechenden Genbankplasmids transformiert (schraffiert). Als Kontrolle wurde der Leervektor pGAD verwendet. Anschließend wurde die Reporterengenaktivität in Anwesenheit (grau) und Abwesenheit (weiß) des Hormons TAC aus den Suspensionskulturen bestimmt. Als Vergleich wurde die Reporterengenaktivität in Gal4_{DBD}-GR_{mH12ΔAF-1} transformierten Klonen mit dem entsprechenden Genbankplasmid in An- bzw. Abwesenheit des Hormons quantifiziert. Die mit dem Kontrollvektor erhaltenen Reporteraktivitäten wurden gleich 1 gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen. Die Abbildung zeigt eine Auswahl verschiedener Isolate der unterschiedlichen Interaktionsgruppen. Das Schaubild zeigt die relativen β-Galaktosidaseaktivitäten eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Gu/RH-II-bindende Protein wurde mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens als Partnerprotein der GU/RNA-Helikase II identifiziert (Valdez et al., 1997). Diese RNA-Helikase gehört zu der DEAD-Box Proteinfamilie und enthält eine ATP-abhängige RNA-Helikasefunktion, sowie eine getrennte RNA-Faltungsaktivität. Die Funktion der beiden Proteine ist zur Zeit noch ungeklärt.

Trip6 wurde ebenfalls mittels eines Two-Hybrid Screens als Partnerprotein des Thyroidhormon- und Retinsäurerezeptors isoliert (Lee et al., 1995). Da diese nukleären Rezeptoren auch in der Lage sind mit der AP-1 Aktivität zu interferieren, könnte Trip6 ein potentieller Kandidat für die

Beteiligung am AP-1 Repressionsprozeß sein. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit das Trip6-Protein und sein Einfluß auf die AP-1 Repression näher untersucht.

3.6 Trip6 ist ein Lim-Domänenprotein

Trip6 wurde erstmals als Thyroidhormonrezeptor interagierendes Protein (Trip) isoliert (Lee et al., 1995). Zudem ist es in der Lage, auch mit einem weiteren Hormonrezeptor, dem Retinsäurerezeptor, in hormonabhängiger Weise zu interagieren. Die bisher publizierte Form von Trip6 besteht aus 476 Aminosäuren. Der N-Terminus des Trip6-Proteins ist extrem prolinhaltig (20%) und der C-Terminus ist aus drei Lim-Domänen aufgebaut (Abb. 12A).

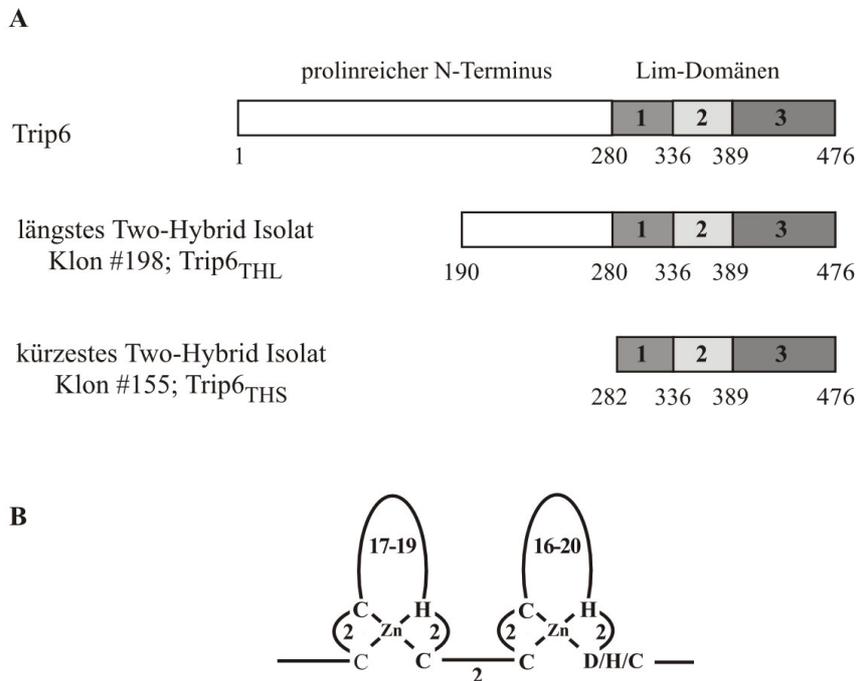


Abb. 12: Schematische Darstellung des Trip6-Proteins und seiner Lim-Domänen.

(A) Trip6 besteht aus 476 Aminosäuren. Es enthält einen prolinreichen N-Terminus und drei Lim-Domänen im C-Terminus. Der Klon #198 (Trip6_{THL}) ist das längste Isolat von Trip6, das im Two-Hybrid Screen gefunden wurde. Es beginnt mit der Aminosäure 190 und enthält den kompletten C-Terminus. Das kürzeste Isolat von Trip6 (Klon #155; Trip6_{THS}) beginnt mit der Aminosäure 282. (B) Schematische Darstellung einer Lim-Domäne. Hierbei handelt es sich um ein Strukturmotiv, welches zwei Zinkfinger enthält. Die Zahlen geben die Zahl der Aminosäuren zwischen den charakteristischen Positionen an.

Lim-Domänen sind eine besondere Form eines doppelten Zinkfingermotivs, dessen schematischer Aufbau in Abb. 12B gezeigt wird. Sie kommen in einigen Homeoboxtranskriptionsfaktoren, Proteinkinasen und anderen Proteinen vor und dienen allgemein als Oberflächenmodule für Protein-Proteinwechselwirkungen (zur Übersicht Dawid et al., 1998). Trip6 wird auf dem Chromosom 7q22 kodiert, eine Region die mit malignen myeloiden Krankheiten und mit Myomen der glatten Gebärmuttermuskulatur in Verbindung gebracht wird (Johnson et al., 1996; Le Beau et al., 1996; Xing et al., 1997; Yi et al., 1998). Trip6 zeigt in den Lim-Domänen eine hohe Homologie (57 % Aminosäure-Identität) zu Zyxin, einem Phosphoprotein, das entlang von Aktinfilamenten und in Focalkontakten (engl. *focal adhesions*; Kontaktstellen mit der extrazellulären Matrix und/oder anderen Zellen) exprimiert wird (Crawford und Beckerle, 1991). Über die Funktion von Zyxin ist noch nichts bekannt, es wird jedoch spekuliert, daß es als Signalüberträger zwischen dem Zytoskelett und dem Zellkern (bedingt durch ein nukleäres Exportsignal) dienen kann (Macalma et al., 1996; Beckerle, 1997).

Es wurden 10 unabhängige Trip6-Hybridklone isoliert, d.h. durch die jeweiligen Genbankplasmide wurden unterschiedliche Regionen des Proteins kodiert. Das längste Isolat war der Klon#198 (ab Aminosäure 190 bis 476), der im weiteren Verlauf der Arbeit häufig verwendet wurde und im folgenden nur mit der Nummer #198 bezeichnet wird. Das kürzeste Trip6-Isolat (#155) beginnt mit der Aminosäure 282. Dies läßt den Schluß zu, daß die Interaktions-oberfläche mit dem GR in den Lim-Domänen von Trip6 liegt.

Um nachfolgend die Funktion des kompletten Proteins (und nicht nur den Teilbereich, der durch den Klon #198 kodiert wurde) genauer zu untersuchen, wurde die komplette cDNA von Trip6 kloniert.

3.7 Die Trip6-cDNA tritt in verschiedenen Spleißformen auf

Das längste Two-Hybrid Isolat von Trip6 umfaßte Teile des N-Terminus und den kompletten C-Terminus des Proteins. Dieser Klon #198 zeigte in diesem Bereich eine 99% Homologie zu der bereits in den Datenbank hinterlegten Form von Trip6. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, daß sich der fehlende N-Terminus durch die Datenbanksequenz vervollständigen läßt.

Die komplette cDNA-Sequenz von Trip6 wurde mit Hilfe von zwei genspezifischen Primern aus HeLa-PolyA⁺-RNA mittels reverser Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden komplett sequenziert um eventuell entstandene Punktmutationen auszuschließen.

Hierbei wurde deutlich, daß Trip6 nicht nur in einer, der Datenbank entsprechenden Variante, sondern in mindestens vier verschiedenen Spleißformen in der Zelle vorkommt. Es handelt sich somit nicht um ein einzelnes Protein, sondern um eine Proteinfamilie. Es wird daher für die Zukunft in Erwägung gezogen, das Protein bzw. die Proteinfamilie umzubenennen. Der Einfachheit halber wurde in dieser Arbeit die Nomenklatur Trip6 beibehalten.

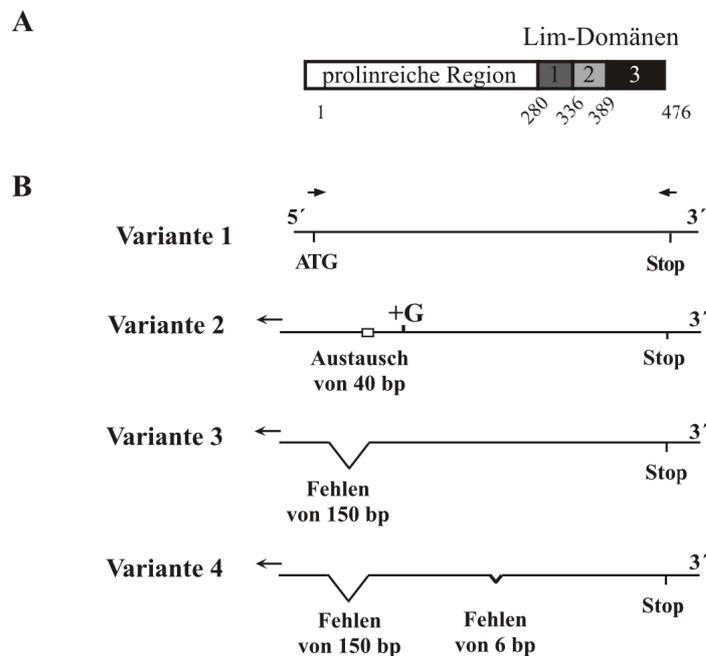


Abb. 13: Die Trip6-cDNA tritt in verschiedenen Spleißformen auf.

(A) Schematische Darstellung des Trip6-Proteins. Die Aminosäuren 1 bis 280 bilden den prolinreichen N-Terminus, gefolgt von den drei Lim-Domänen. (B) Zusammenfassung der bisher sequenzierten verschiedenen Varianten der Trip6-cDNA. Mit PolyA⁺-mRNA aus HeLa-Zellen wurde eine RT-PCR mit dem in Variante 1 dargestellten Primerpaar durchgeführt. Die dabei entstandenen cDNA-Fragmente wurden subkloniert und sequenziert. Die Variante 1 entspricht der publizierten Genbank-Sequenz von Trip6. Die Pfeile bei den Varianten 2, 3 und 4 deuten an, daß die Sequenz am 5'Ende noch nicht komplett ist, d.h. noch kein kompletter offener Leserahmen bekannt ist.

Im Teil A der Abbildung 13 ist das Trip6-Protein schematisch, maßstäblich zur cDNA dargestellt. Die Abb. 13 B zeigt eine Zusammenfassung der verschiedenen Spleißformen. Die Variante 1 entspricht der Datenbank-Sequenz und wurde im folgenden in dieser Arbeit verwendet. Sie umfaßt die bisher einzige komplette cDNA des Trip6-Proteins.

Bei der Variante 2 sind 40 Basenpaare ausgetauscht und eine zusätzliche Base eingeführt. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserasters. Nimmt man an, daß der Leserahmen des Carboxy-Terminus bei allen Varianten beibehalten wird, so ist bei keiner der Varianten die kodierende Sequenz am 5'Ende komplett, d.h. es ist bisher noch kein potentiell Startkodon ATG mit davorliegenden Stopkodons im richtigen Leseraster erkennbar. Dies wurde in der Abbildung durch die nach links gerichteten Pfeile angedeutet.

In der Variante 3 fehlen 150 Basenpaare, was im Protein zu einer Veränderung im N-Terminus führt. Die Variante 4 unterscheidet sich nur unwesentlich von der Variante 3. Auffallend ist, daß bisher keine Variationen im C-Terminus entdeckt wurden, was darauf hindeutet, daß dieser Bereich des Proteins wichtig für seine Funktion und daher konserviert ist.

3.8 Antisense-Trip6-RNA erhöht das Transaktivierungspotential und erniedrigt das Transrepressionspotential des GR

Um die Bedeutung des Trip6-Proteins für Transaktivierung oder AP-1 Repression durch den GR zu untersuchen, wurde die Proteinmenge von Trip6 in der Zelle verändert.

Zunächst wurde die Trip6 Proteinmenge durch Überexpression erhöht und nachfolgend der Einfluß auf Transaktivierung und Transrepression des GR getestet. Die Überexpression des gesamten Proteins könnte zu einer Verbesserung der AP-1 Repression durch den GR führen, falls Trip6 nur in limitierenden Mengen in der Zelle vorliegt. Desweiteren könnte durch die Überexpression eines Teilbereiches von Trip6, der mit GR interagiert, die Interaktion des GR mit dem endogenen Trip6-Protein gestört werden und somit das Proteinfragment eine „dominant negative“ Funktion ausüben. Für die Überexpression in HeLa-Zellen wurden das gesamte Trip6-Protein (Variante 1) und der durch Klon #198 kodierte Teilbereich von Trip6 verwendet. Als Kontrolle wurde der zugehörige Leervektor (pcDNA3.1-HA) ebenfalls in HeLa-Zellen überexprimiert.

Die Überexpression des gesamten Trip6-Proteins und der Teilsequenz ab der Aminosäure 190 bis 476 zeigte keinen Effekt auf die beiden GR-Funktionen (Daten nicht gezeigt). Trip6 liegt somit nicht in limitierender Menge in der Zelle vor und der eingesetzte Teilbereich ab der Aminosäure 190 zeigt keine „dominant negative“ Wirkung.

Ist Trip6 an der AP-1 Repression beteiligt, so sollte die Erniedrigung der endogenen Proteinmenge von Trip6 durch Expression einer „antisense“ RNA zu einer Verschlechterung der Transrepression führen.

Zu diesem Zweck wurde die DNA-Sequenz des Klons #198 in der umgekehrten Orientierung in einen Expressionsvektor kloniert, was zur Transkription einer mRNA führte, die der kodierenden Sequenz komplementär ist. Diese sog. „antisense“-RNA hybridisiert mit dem endogenen Trip6-Transkript. Solche RNA-RNA-Hybride werden von dem Enzym RNaseH erkannt und abgebaut. Dadurch verringert sich die exprimierte Proteinmenge in der Zelle (zur Übersicht Schlingensiepen, 1997).

HeLa-Zellen wurden mit dem „antisense“-Trip6-Konstrukt transfiziert und anschließend die AP-1 Repression und die Transaktivierung durch den GR mit Hilfe geeigneter Reportergene gemessen. Abb. 14 zeigt das Ergebnis eines solchen „antisense“-Experiments.

Zur Messung der AP-1 Repression wurde ein -517-KollagenaseI-Luziferasereporter verwendet. Die Luziferaseaktivitäten wurde mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert und anschließend das Verhältnis zwischen den reprimierten (TPA+Dex) und den induzierten (TPA) Luziferaseaktivitäten gebildet.

Die so erhaltenen relativen Luziferaseaktivitäten wurden in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Repression des AP-1 Reportergens ist im Vergleich zur Leervektorkontrolle im Falle der mit dem „antisense“-Konstrukt transfizierten Zellen deutlich reduziert (um 47,5%) (Abb. 14A). Die TPA-induzierten Werte der „antisense“-Transfektion und der Leervektorkontrolle waren vergleichbar hoch und wurden durch das „antisense“-Konstrukt nicht beeinflusst.

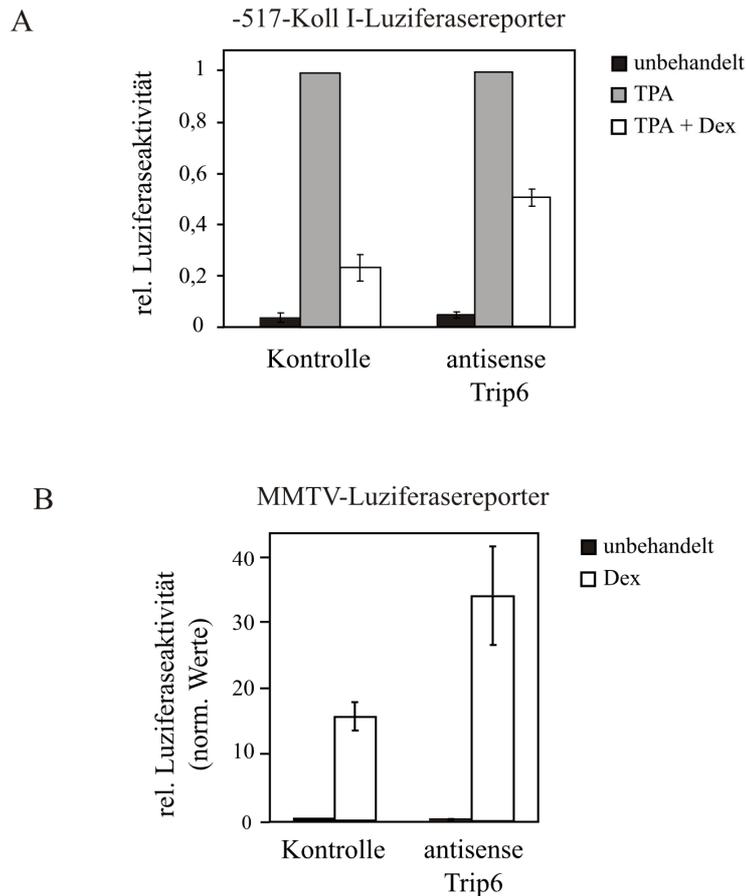


Abb. 14: Die Expression eines „antisense“-Konstruktes von Trip6 beeinflusst die AP-1 Repression und die Transaktivierung durch den GR.

(A) Transrepression: $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran mit jeweils $1 \mu\text{g}$ eines -517-Koll I-Luziferasereporters und eines Trip6-„antisense“-Konstruktes transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen für 16 Stunden mit 60 ng/ml TPA (grau), mit 60 ng/ml TPA und 10^{-7} M Dexamethason gleichzeitig (weiß) oder nicht behandelt (schwarz). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (pcDNA3.1-) zusammen mit dem Reporter gen transfiziert und genau wie die „antisense“-transfizierten Zellen behandelt. Die Luziferaseaktivität im reprimierten Zustand wurde durch die Luziferaseaktivität nach TPA-Induktion dividiert und die relativen Luziferaseaktivitäten in dem Schaubild aufgetragen (Renilla normalisiert).

(B) Transaktivierung: $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran mit jeweils $1 \mu\text{g}$ eines pHcwt-Luziferasereporters und eines Trip6-„antisense“-Konstruktes transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen für 16 Stunden mit 10^{-7} M Dexamethason (weiß) oder nicht behandelt (schwarz). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (pcDNA3.1-) zusammen mit dem Reporter gen transfiziert und genau wie die „antisense“-transfizierten Zellen behandelt.

Das Schaubild zeigt die Renilla-normalisierten Enzymaktivitäten. In A und B sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente und die sich daraus ergebenden Standardabweichungen gezeigt.

Die Transaktivierung durch den GR wurde mit Hilfe eines MMTV-Reportergens analysiert. Das Transaktivierungspotential des GR wurde durch die Expression des „antisense“-Konstruktes verdoppelt (Abb. 14B). Die basale Aktivität des Reporters wurde durch die „antisense“-RNA nicht beeinflusst.

Dies deutet darauf hin, daß Trip6 ein negativ regulierender Faktor ist, der an der Transaktivierung und an der AP-1 Repression durch den GR beteiligt ist.

3.9 Herstellung eines Antiserums gegen Trip6

Für die weitere biochemische Charakterisierung von Trip6 war es notwendig, ein für das Protein spezifisches Antiserum zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurde die cDNA des längsten Two-Hybridklons (#198) in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert, der für ein Histidin-Peptid kodiert (Wiederholung von sechs Histidinresten). Somit war es möglich das rekombinante His-Fusionsprotein im Bakterienstamm BL21 zu exprimieren und mit Hilfe einer Nickel-Chelat-Säule aufzureinigen. Das unter denaturierenden Bedingungen hergestellte rekombinante Protein wurde von der Firma Genosys (Pempisford, UK) in zwei Kaninchen (Kaninchen-Nr. 354 und 355) injiziert. Vor der ersten Injektion wurde beiden Kaninchen Blut abgenommen, Serum daraus gewonnen und als Präimmenserum aufbewahrt. Zur Immunisierung wurde jeweils 1 mg des rekombinanten Proteins eingesetzt. Die Immunisierung wurde in zweiwöchigem Abstand wiederholt. Nach der sechsten Injektion wurde das gesamte Blut zur Gewinnung des Trip6-Antiserums verwendet.

Da die Sequenz des längsten Two-Hybridklons (#198) in allen Trip6-Varianten vorkommt, erkennt das Antiserum wahrscheinlich alle verschiedenen Spleißformen des Proteins.

Abb. 15 zeigt einen Western-Blot des Trip6-Proteins in verschiedenen Zelllinien. Die Detektion erfolgte mit dem ungereinigten polyklonalen Kaninchenantiserum Nr. 355, da dieses im Gegensatz zum Serum Nr. 354 stärkere spezifische Banden und weniger Hintergrundsignale lieferte. In Spur 1 wurden Gesamtzellextrakte von HeLa-Zellen aufgetragen. Der Antikörper zeigt ein Signal bei einer Masse von ca. 50 kDa. Diese Bande würde der berechneten Größe der Variante 1 von Trip6 entsprechen. Zusätzlich detektiert der Antikörper noch eine Bande mit einer geringeren Masse

(ca. 40 kDa). Ob dies eine andere Spleißform von Trip6 ist oder ob es sich um eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers in HeLa-Zellen handelt, ist bisher noch nicht geklärt.

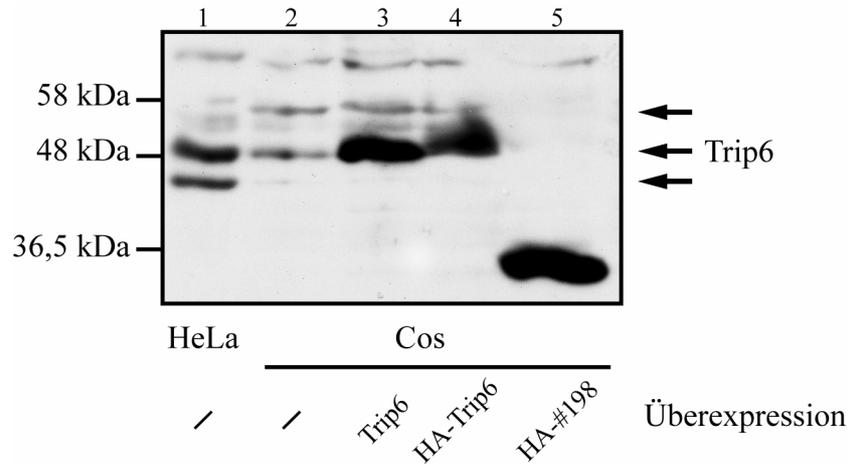


Abb. 15: Ein polyklonales Antiserum gegen Trip6 erkennt das Protein im Western-Blot. Gesamtzellextrakte verschiedener Zelllinien wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das Trip6-Protein anschließend durch Western-Blotanalyse mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenantiseraums detektiert. In der Spur 1 wurden Extrakte von HeLa-Zellen geladen. In Spur 2 wurden Cos7-Zellextrakte, in Spur 3 und 4 Cos7-Extrakte nach Überexpression eines Trip6 bzw. eines HA-Trip6 Konstruktes geladen. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden in Spur 5 Cos7-Extrakte von HA-#198 überexprimierenden Zellen analysiert.

Das in HeLa-Zellen erhaltene Muster unterscheidet sich von den detektierten Banden aus Cos7-Gesamtzellextrakten. In Spur 2 wurden Extrakte von untransfizierten Cos7-Zellen aufgetragen. Auch hier wurde ein Protein von ca. 50 kDa detektiert. Das in HeLa-Zellen beobachtete kleinere Signal (40 kDa) fehlt. Zusätzlich zeigt der Antikörper noch eine reaktive Bande bei ca. 56 kDa. Nach der Überexpression von Trip6 bzw. einer mit einem HA-Epitop versehenen Version von Trip6 in Cos7-Zellen (Spuren 3 und 4), erkennt der Antikörper ein starkes Signal, das der 50 kDa-Bande in nicht-transfizierten Zellen entspricht. Dieses Signal ließ sich somit eindeutig Trip6 zuordnen.

Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurden Cos7-Zellen mit einer Version des klons #198 transfiziert, die mit einem HA-Epitop versehen war. Auch dieses Fusionsprotein mit der berechneten Masse von ca. 32 kDa wird vom Antiserum erkannt. Die

Tatsache, daß das Signal für das endogene Trip6 in dieser Spur kaum sichtbar ist, kann auf eine geringere Lademenge des Proteins zurückgeführt werden (Coomassifärbung des Gels, Daten nicht gezeigt).

Das 50 kDa Trip6-Protein kann mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenantiseraums in verschiedenen Zelllinien detektiert werden. Zusätzliche Banden mit unterschiedlicher Größe könnten für die verschiedenen Spleißformen des Proteins spezifisch sein, was zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht geklärt wurde.

Nachfolgend wurde überprüft, ob sich der polyklonale Antikörper auch für Immunopräzipitationen eignet. Hierzu muß er in der Lage sein, das native Protein zu erkennen. Abb. 16 zeigt eine Immunopräzipitation eines in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten Trip6-Proteins. Trip6 wurde hierzu mit dem Trip6-Antiserum oder mit dem Präimmunserum inkubiert und die Antikörper-Antigenkonjugate mit Hilfe von ProteinA-gekoppelten Sepharosekügelchen präzipitiert.

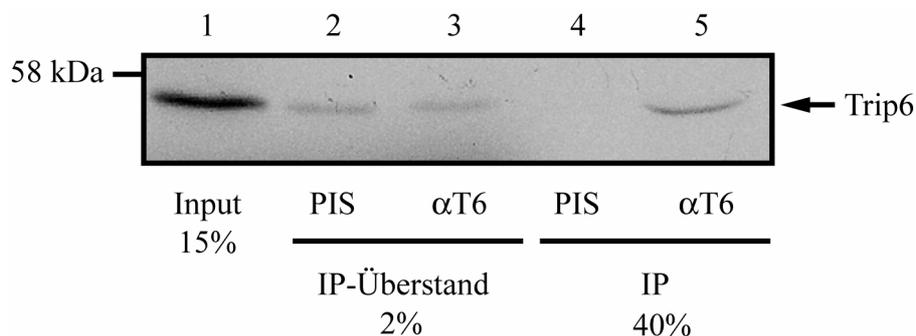


Abb. 16: Der polyklonale Trip6-Antikörper kann *in vitro* translatiertes Trip6 spezifisch immunopräzipitieren.

Ein in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiertes Trip6-Protein wird durch das polyklonale Kaninchenantiserum spezifisch präzipitiert. In der Spur 1 wurden 15% der in den einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge des *in vitro* translatierten Materials aufgetragen (Input). In den Spuren 2 und 3 wurde der Überstand der Immunopräzipitation (IP) geladen, wobei in Spur 2 das Präimmunserum (PIS) des Kaninchens verwendet wurde. In den Spuren 4 und 5 wurde das Immunopräzipitat des Präimmunserums bzw. des Trip6-Antiserums (αT6) aufgetragen. Der Pfeil markiert die erwartete Größe des *in vitro* translatierten Proteins. Die Prozentangaben beziehen sich auf die in die einzelnen Präzipitationen eingesetzte Menge des *in vitro* translatierten Materials.

Die Überstände und das Präzipitat der beiden Ansätze wurden einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterworfen. Das Gel wurde anschließend getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen. In Spur 1 wurde 15% der in die einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge des *in vitro* translatierten Materials aufgetragen (Input). Trip6 ist in den Überständen beider Präzipitationen (2% im Bezug auf die eingesetzte Menge) noch nachzuweisen (Spuren 2 und 3), d.h. der Trip6-Antikörper präzipitiert nur einen geringen Teil des radioaktiven Materials. Das Immunpräzipitat (40% bezogen auf die eingesetzte Menge) zeigt nur bei der Verwendung des Trip6-Antikörpers ein radioaktives Signal (Spur 5), dieses Signal fehlt in der Kontrollpräzipitation mit dem zugehörigen Präimmunserum (Spur 4).

Das polyklonale Kaninchenantiserum gegen Trip6 ist in der Lage, das *in vitro* translatierte Protein spezifisch zu präzipitieren. Der Antikörper kann somit für Immunopräzipitationen des Proteins eingesetzt werden, ist allerdings in dieser Anwendung nicht sehr effizient. Es werden nur ca. 10% des eingesetzten Materials immunopräzipitiert.

3.10 Trip6 ist ein nukleäres Protein

Für die weitere Charakterisierung des Proteins wurde seine subzelluläre Lokalisierung mit Hilfe des oben beschriebenen Antiserums im Western-Blot untersucht. Hierzu wurde bei Cos7-Zellen das Zytoplasma von den Zellkernen getrennt und diese dann mit RIPA-Puffer aufgeschlossen. Je 1/50 der so erhaltenen Zytoplasma- und Kernextrakte wurden einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unterworfen und das Trip6-Protein mit Hilfe des polyklonalen Antiserums detektiert (Abb. 17).

In Spur 4 wurde das Gesamtzell-Lysat der verwendeten Cos7-Zellen aufgetragen (1/30). Nach der Antikörperdetektion ergibt sich ein zur Abb. 15 vergleichbares Muster. Das 50 kDa Trip6-Protein ist durch einen Pfeil rechts markiert. Das Trip6 Signal kann mit Hilfe der in Spur 1 geladenen Extrakte von HA-Trip6 überexprimierenden Cos7-Zellen eindeutig zugeordnet werden (vgl. Abb. 15).

Trip6 läßt sich verstärkt in den Kernextrakten nachweisen, ist jedoch auch in den Zytoplasmaextrakten schwach detektierbar. In den Kernextrakten werden zusätzlich zwei Signale von ca. 70 kDa und 40 kDa detektiert. Das Signal für die ca. 56 kDa große Bande reichert sich im

Zytoplasma an. Ob es sich hierbei um verschiedene Spleißformen handelt ist, wie bereits oben diskutiert, bisher nicht geklärt.

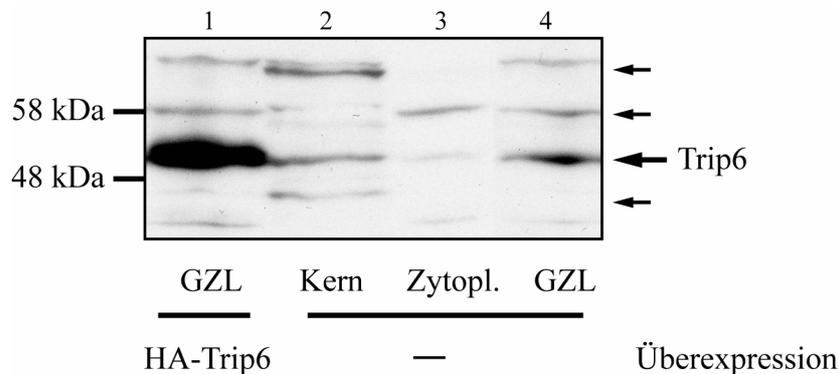


Abb. 17: Trip6 ist ein vorwiegend nukleäres Protein.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung des Trip6-Proteins wurden Zytoplasma- und Kernextrakte von $2 \cdot 10^7$ Cos7-Zellen hergestellt. Je 1/50 der Zytoplasma- und Kernextrakte und 1/30 des Gesamtzell-Lysats (GZL) wurden einer SDS-PAGE unterworfen und anschließend das Trip6-Protein durch Western-Blotanalyse mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenantiserums detektiert. Als Kontrolle wurden in der Spur 1 Gesamtzell-Lysate von HA-Trip6 überexprimierenden Cos7-Zellen aufgetragen. In Spur 2 wurden Kernextrakte, in Spur 3 Zytoplasmaextrakte und in Spur 4 Gesamtzell-Lysat von nicht-transfizierten Cos7-Zellen geladen. Der Pfeil markiert das für Trip6 spezifische Western-Blotsignal.

Die vorwiegend nukleäre Lokalisierung wurde auch mit Hilfe der Immunocytochemie bestätigt. Hierzu wurden Cos7-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für verschiedene Trip6-Fusionsproteine (Ha-Trip6 enthält ein HA-Epitop, Flag-Trip6 enthält ein Flag-Epitop) kodieren, transient transfiziert und auf Deckgläschen kultiviert. Nach Paraformaldehydfixierung der Zellen wurde das entsprechende Fusionsprotein mit Hilfe der jeweiligen spezifischen Antikörper markiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des sekundären Antikörpers, der einen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder TRITC) trägt. Anschließend ließ sich die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch bestimmen. Zur Detektion der Zellkerne wurden die fixierten Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff Bisbenzimid H 33258 (Hoechst Farbstoff) markiert (Abb. 18 B und D).

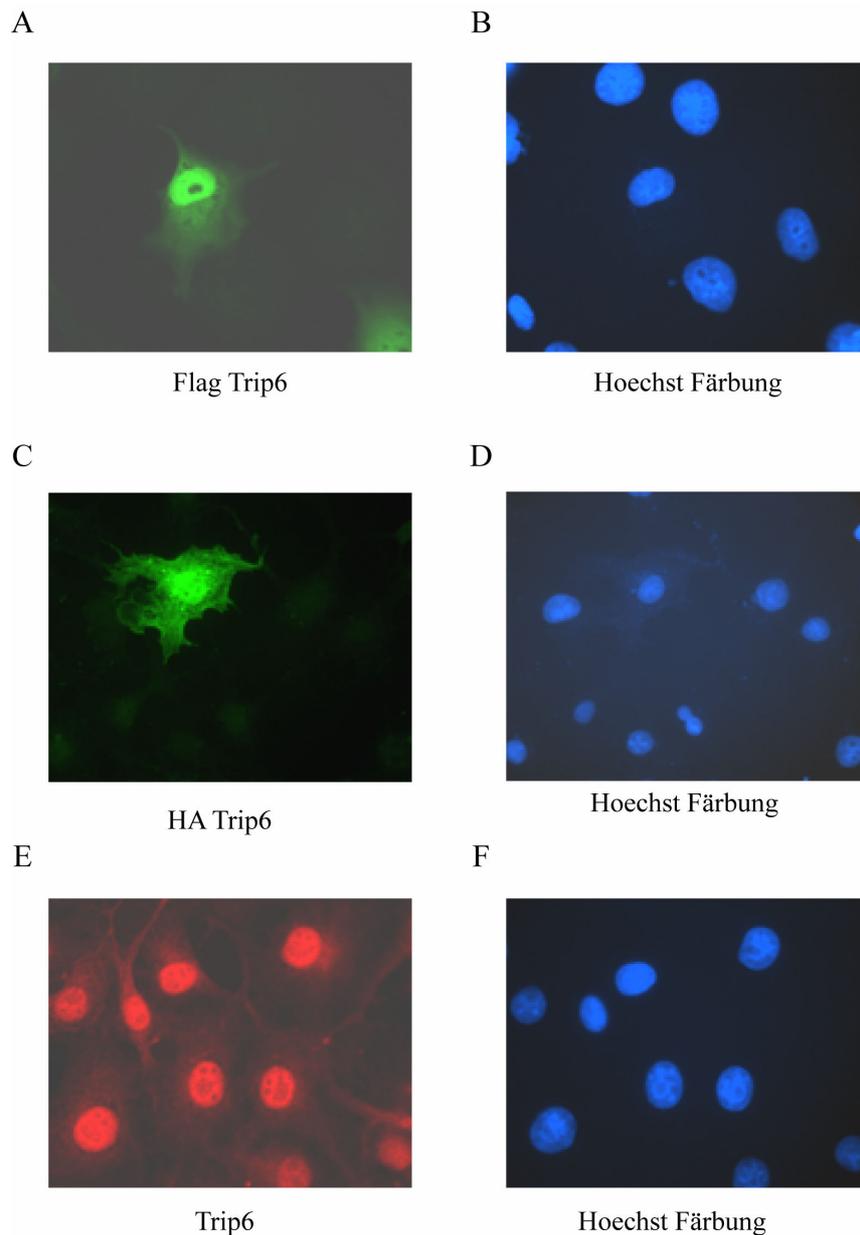


Abb. 18: Immunfluoreszenzanalyse der subzellulären Lokalisation des Trip6-Proteins.

Transient transfizierte oder nicht-transfizierte Cos7-Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert und das Trip6-Protein durch geeignete Antikörper detektiert. (A) Transient transfiziertes Flag-Trip6 wurde unter Verwendung des polyklonalen Flag-Antikörpers detektiert. Parallel wurden die Zellkerne mit Hoechst Farbstoff markiert (B,D,F). (C) Transient transfiziertes HA-Trip6 wurde unter Verwendung des monoklonalen HA-Antikörpers 12CA5 detektiert. (E) Nicht-transfizierte Cos7-Zellen wurden für die Detektion des endogenen Trip6-Proteins mit Hilfe des polyklonalen Trip6-Antiserums verwendet.

Beide Fusionsproteine zeigen eine deutliche nukleäre Lokalisierung. Zudem zeigt sich auch im Zytoplasma der transfizierten Zellen ein schwächeres Signal, das in den nicht-transfizierten Zellen nicht sichtbar ist. In Abb. 18 E und F wurden das endogene Trip6-Protein in nicht-transfizierten Cos7-Zellen unter Verwendung des polyklonalen Kaninchenantiserums detektiert. Auch hier zeigt sich die gleiche subzelluläre Lokalisierung des endogenen Proteins und der Fusionsproteine. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik konnte die im Western-Blot detektierte, hauptsächlich nukleäre Lokalisation des Trip6-Proteins bestätigt werden.

3.11 Trip6 interagiert mit GR *in vitro*

Die beobachtete Two-Hybrid Interaktion sollte durch einen zweiten, von Hefezellen unabhängigen Ansatz bestätigt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Interaktion *in vitro* mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen nachzuweisen. Hierzu wird eines der interagierenden Proteine als Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in löslicher Form in Bakterien exprimiert. Die Affinität von GST zu Glutathion ermöglicht die einfache Aufreinigung durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Glutathion.

Diese Affinität macht man sich auch beim *in vitro*-Interaktionstest zunutze. Während ein Protein als GST-Fusion vorliegt, wird das potentielle Partnerprotein in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert. Beide Komponenten werden gemischt und das GST-Fusionsprotein anschließend mit Hilfe von an Agarose immobilisiertem Glutathion präzipitiert. Interagieren die zwei Proteine, so kann das radioaktive Protein präzipitiert und nach der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durch Autoradiographie detektiert werden.

Abb. 19 zeigt das Autoradiogramm des *in vitro*-Interaktionstests von GR mit Trip6. Hierbei wurde das längste Isolat des Two-Hybrid Screens (#198) als GST-Fusion eingesetzt und GR in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert. In Spur 1 wurde 10% der in den einzelnen Reaktionen eingesetzten Menge aufgetragen (Input). Das radioaktive GR-Signal kann nur beim Ansatz mit GST-Trip6 im Präzipitat nachgewiesen werden, nicht jedoch im Kontrollansatz, in dem nur die Glutathion-S-Transferase (GST) eingesetzt wurde.

Somit konnte die beobachtete Two-Hybrid Interaktion von GR mit Trip6 *in vitro* bestätigt werden.

Diese *in vitro*-Interaktion ist jedoch nicht hormonabhängig (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund wurde auch schon in anderen Arbeitsgruppen mit anderen hormonabhängigen Interaktionspartnern der Steroidhormonrezeptoren beobachtet (A. Cato, pers. Mitteilung). Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Hitzeschockproteine, die den nicht-hormonbeladenen Rezeptor binden, bei den verwendeten Pufferbedingungen bereits ohne Hormon leicht vom GR dissoziieren, und dadurch Interaktionsoberflächen auf dem Rezeptor zugänglich werden

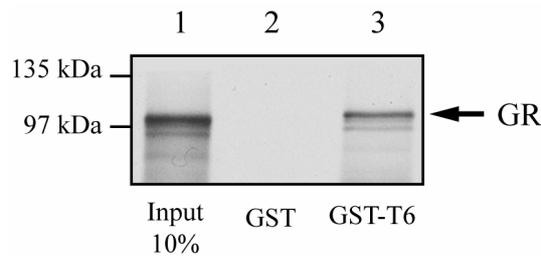


Abb. 19: Trip6 interagiert mit dem Glukokortikoidrezeptor *in vitro*.

Ein in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiertes GR-Protein wird durch ein an Glutathion-Agarose immobilisiertes GST-Trip6 Fusionsprotein (GST-T6) spezifisch präzipitiert. Als Kontrolle dient das an Glutathionbeads gekoppelte GST-Protein. In Spur 1 wurde 10% der in den einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge des *in vitro* translatierten Materials aufgetragen (Input). In Spur 2 und 3 wurden 30% im Bezug auf den Input geladen. Der Pfeil markiert die erwartete Größe des *in vitro* translatierten Proteins.

Der nächste Schritt wäre nun, die Interaktion der beiden Proteine auch *in vivo* in Säugerzellen mit Hilfe einer Koimmunopräzipitation nachzuweisen. Solche Experimente scheiterten bisher daran, daß keine geeigneten, nicht denaturierenden Bedingungen für die effiziente Extraktion des Trip6-Proteins aus dem Zellkern gefunden wurden, unter denen sich anschließend die Koimmunopräzipitation von Trip6 und GR erfolgreich durchführen ließ.

3.12 Trip6 interagiert mit der AP-1 Komponente cFos in einem GST-Fusionsprotein-Interaktionstest

Mit Hilfe des GST-Fusionsprotein-Interaktionstests konnte nun auch die Interaktion mit anderen potentiellen Partnerproteinen getestet werden. Da Trip6 eine Rolle bei der AP-1 Repression des GR spielt (siehe „antisense“ Experiment Abb. 14), wurde als nächstes überprüft, ob Trip6 in der Lage ist, direkt mit AP-1 zu interagieren.

Hierzu wurde ein GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit den beiden AP-1 Hauptkomponenten cJun und cFos durchgeführt. In Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiertes cJun- und cFos-Protein wurden mit dem GST-Trip6 Fusionsprotein oder GST als Kontrolle gemischt und anschließend mit Hilfe von an Agarose immobilisiertem Glutathion präzipitiert. Abb. 20 zeigt das Autoradiogramm des GST-Fusionsprotein-Interaktionstests.

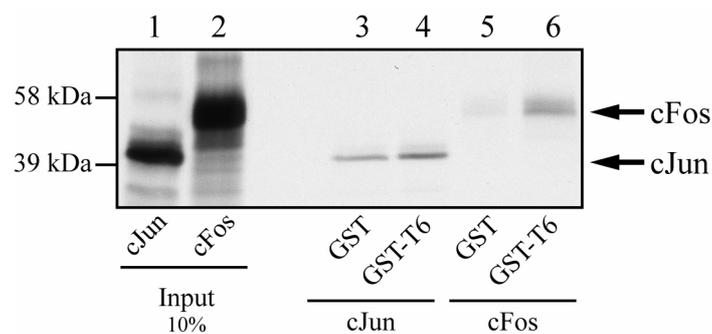


Abb. 20: Trip6 interagiert mit cFos *in vitro*.

In Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiertes cJun und cFos wird mit an Glutathion-Agarose gekoppeltem GST-Trip6 Fusionsprotein (GST-T6) oder als Kontrolle mit GST-Protein inkubiert und anschließend präzipitiert. In den Spuren 1 und 2 wurden 10% der in den einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge des *in vitro* translatierten Materials aufgetragen (Input). In den Spuren 3 und 4 sind die Präzipitationen von cJun mit dem GST-Protein bzw. dem GST-Trip6 Fusionsprotein geladen, in den Spuren 5 und 6 die entsprechende Präzipitation von cFos (es wurden jeweils 30% des eingesetzten Materials aufgetragen). Die Pfeile markieren die erwarteten Größen der *in vitro* translatierten Proteine cJun und cFos.

In den Spuren 1 und 2 wurden jeweils 10% der in die einzelnen Reaktionen eingesetzten Menge aufgetragen (Input), die geladene Menge bei allen Präzipitaten entspricht 30% des eingesetzten *in*

in vitro translatierten Materials. Das radioaktive cJun-Signal kann sowohl bei dem Ansatz mit GST-Trip6 im Präzipitat detektiert werden, als auch in der GST-Kontrolle (Spuren 3 und 4).

Anders jedoch das cFos-Protein; das radioaktive cFos-Signal kann nur bei dem Ansatz mit GST-Trip6 im Präzipitat detektiert werden, nicht jedoch im Kontrollansatz, wo nur die Glutathion-S-Transferase (GST) eingesetzt wurde (Spuren 5 und 6).

Es ist daher anzunehmen, daß Trip6 mit cFos interagieren kann. Über eine mögliche Interaktion von Trip6 mit cJun kann keine Aussage getroffen werden, weil cJun auch unspezifisch mit GST interagiert.

Auffallend ist, daß die Interaktion mit cFos im GST-Fusionsprotein-Interaktionstest wesentlich schwächer ist, als die für den GR beobachtete Interaktion. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß AP-1 *in vivo* in vielfältiger Weise modifiziert ist und dadurch die Interaktion mit Trip6 stabilisiert werden könnte. Ein *in vivo* Beweis für diese Interaktion steht bisher aus den bereits im Abschnitt 3.11 genannten Gründen noch aus.

Die potentielle Interaktion von Trip6 mit anderen Mitgliedern der Jun/Fos-Familie wurde bisher noch nicht überprüft.

3.13 Trip6 interagiert auch mit einer Komponente des Transkriptions-faktors NF-κB (RelA, p65) in einem GST-Fusionsprotein-Interaktionstest

Der Glukokortikoidrezeptor ist auch in der Lage, die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB zu reprimieren. Ein potentieller molekularer Mechanismus beruht auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung des GR mit NF-κB (hauptsächlich über die Komponenten RelA (p65 und p50).

Aus diesem Grund wurde zunächst eine potentielle Interaktion von Trip6 mit der NF-κB Komponente RelA (p65) überprüft. Das mit ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiertes RelA wurde mit dem GST-Trip6 Fusionsprotein oder GST als Kontrolle gemischt und anschließend mit Hilfe von an Agarose immobilisiertem Glutathion präzipitiert. Abb. 21 zeigt das Autoradiogramm des GST-Fusionsprotein-Interaktionstests von Trip6 mit RelA. In Spur 1 wurde 10% der in die einzelnen Reaktionen eingesetzten Menge aufgetragen (Input). Das radioaktive RelA-Signal kann nur bei dem Ansatz mit GST-Trip6 im Präzipitat detektiert werden, nicht jedoch im

Kontrollansatz, bei dem nur die Glutathion-S-Transferase (GST) eingesetzt wurde (Spuren 2 und 3).

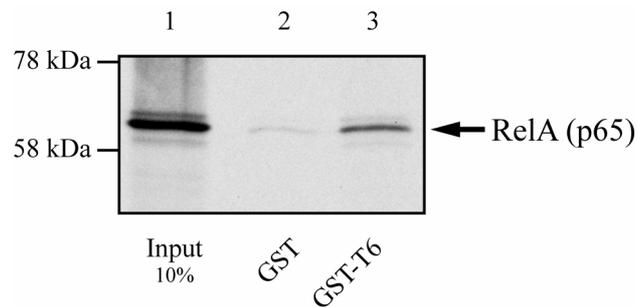


Abb. 21: Trip6 interagiert mit RelA (p65) *in vitro*.

In Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiertes RelA wird durch das GST-Trip6 Fusionsprotein (GST-T6) mit Hilfe von an Agarose immobilisiertem Glutathion spezifisch präzipitiert. Als Kontrolle diente das immobilisierte GST-Protein. In der Spur 1 wurden 10% der in den einzelnen Präzipitationen eingesetzten Menge des *in vitro* translatierten Materials aufgetragen (input), in den einzelnen Präzipitationen 30%. Der Pfeil markiert die erwartete Größe des *in vitro* translatierten Proteins.

Trip6 ist somit in der Lage, in einem GST-Fusionsprotein-Interaktionstest an cFos und an RelA zu binden. Welche Domänen von Trip6 bzw. cFos und RelA für diese Interaktion benötigt werden, wird im Moment im Rahmen einer Diplomarbeit analysiert.

Andere NF-κB Komponenten wurden bisher nicht getestet. Die Interaktion von Trip6 mit RelA wurde kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens gefunden (Zhao et al., 1999).

3.14 Trip6 hat transkriptionelle Repressorfunktion

Trip6 scheint ein wichtiger Faktor bei der AP-1 Repression durch den GR zu sein, wie das „antisense“-Experiment zeigte (Abb. 14). Wie lässt sich generell die Repression eines Transkriptionsfaktors erklären? Hier gibt es zumindest drei mögliche Mechanismen wie ein Protein mit der Transaktivierungsfunktion eines anderen Faktors interferieren kann.

1. Das Protein könnte mit dem Transkriptionsfaktor um gemeinsame Koaktivatoren konkurrieren und ihn dadurch in seiner Aktivität hemmen.
2. Das Protein könnte durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor wichtige Proteinoberflächen blockieren, die normalerweise für die Bindung von Koaktivatoren notwendig sind.
3. Das Protein könnte selbst eine Repressorfunktion tragen und beispielsweise durch Interaktion mit chromatinmodifizierenden Faktoren die Transkription hemmen.

Die dritte Möglichkeit läßt sich mit Hilfe von Gal4_{DBD}-Fusionsproteinen und deren Effekt auf ein Gal4-abhängiges Reportergen untersuchen. Trip6 wurde hierzu an die DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 fusioniert und der Effekt des Fusionsproteins auf ein Reportergen analysiert, welches fünf Gal4-Bindestellen vor einem heterologen Thymidinkinase-Promotor (Position -109 bis +52) besitzt. Dieser Gal₅-Tk-Luziferasereporter hat eine hohe Basalaktivität, die durch konstitutive Bindung von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (z.B. SP-1, NF-1) an den Thymidinkinasepromotor verursacht wird. Besitzt ein Protein eine autonome Repressionsfunktion, so wird die Expression des Reportergens reprimiert.

Abb. 22 zeigt das Ergebnis einer solchen Transfektion. Im oberen Teil wurde das Trip6-Protein schematisch dargestellt (Abb. 22A). Der prolinreiche N-Terminus (weiß) und die drei Lim-Domänen (grau bzw. schwarz) sind markiert. Im Teil B der Abb. 22 wurden die verwendeten Fusionsproteine schematisch dargestellt.

Als Kontrolle wurde eine Gal-Fusion des Thyroidhormonrezeptors (TR) verwendet. Solange der Rezeptor keinen Liganden gebunden hat, interagiert er mit dem Repressorprotein N-CoR, welches in der Lage ist, die Transkription durch Rekrutierung von Histon-Deazetylasen zu reprimieren (Hörlein et al., 1995, Alland et al., 1997; Heinzel et al., 1997).

HeLa-Zellen wurden mit dem Gal₅-Tk-Luziferasereporter zusammen mit einem Expressionsplasmid für die jeweiligen Gal-Fusionsproteinen transfiziert, nach zwei Tagen die Luziferaseaktivität gemessen und mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert (Abb. 22).

Reporteraktivitäten wurden durch die mit der Gal_{DBD} erhaltene Reporteraktivität dividiert und die relativen Werte in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Gal-Fusion des längsten Two-Hybridisolates von Trip6 (#198) reprimiert den Gal-Reporter ca. 8-fach, das gesamte Trip6 ist etwas weniger effektiv in der Repression. Die Repression durch Trip6 ist auch bezogen auf die Basalaktivität des Reporters deutlich sichtbar (2-3 fach).

Trip6 ist ein effizienter Repressor des Gal₅-Reporters und besitzt somit eine autonome Repressionsfunktion.

3.14.1 Der Repressionseffekt ist abhängig von der eingesetzten DNA-Menge und der Anwesenheit von Gal4-Bindestellen im Promotor

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob sich der beobachtete Repressionseffekt durch die Variation der Proteinmenge optimieren lässt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit steigenden Mengen des Expressionsvektors für Gal-Trip6 oder der Gal_{4DBD} transfiziert. Bei allen Transfektionen wurde die gleiche Menge des Reportergens eingesetzt. Die Reporteraktivität zusammen mit der Gal_{DBD} nimmt mit steigender DNA-Menge zu und erreicht bei 1 µg DNA ihr Maximum. Der Repressionseffekt von Gal-Trip6 nimmt ebenfalls mit steigender Menge Expressionsplasmid zu und ist bei 1 µg maximal. Für alle weiteren Experimente wurde deshalb 1 µg Gal₅-Reporter zusammen mit 1 µg des entsprechenden Plasmids für das Gal-Fusionsprotein verwendet.

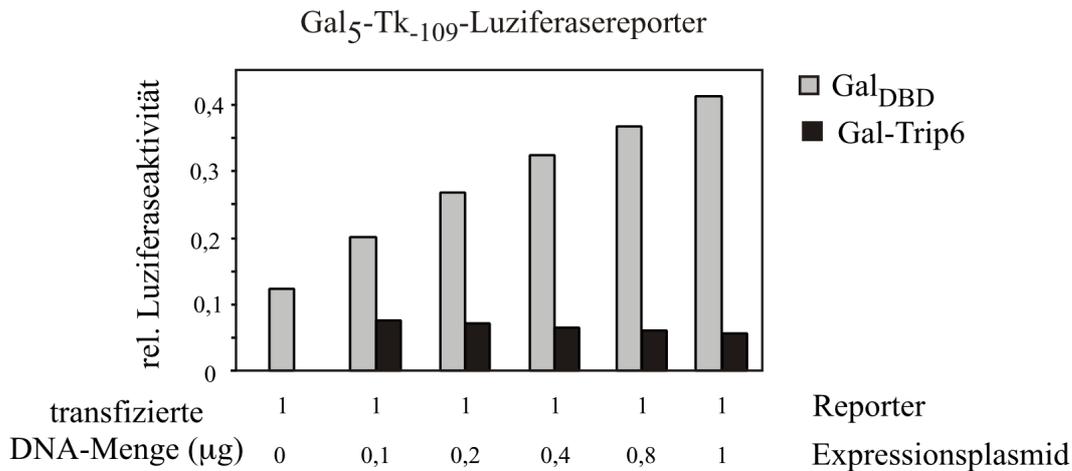


Abb. 23: Der Repressionseffekt von Trip6 ist von der eingesetzten DNA-Menge abhängig. $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Calcium-Phosphatpräzipitation mit jeweils 1 µg eines Gal₅TK-Luziferasereporters, sowie den angegebenen Mengen der entsprechenden Gal_{DBD}-Fusionsproteinkonstrukte transfiziert. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA betrug in jedem Ansatz 2 µg, und wurde bei Bedarf mit pBlueskript aufgefüllt. Als Expressionsplasmide wurden die Gal_{DBD} (grau) und Gal-Trip6 (schwarz) verwendet. Alle Transfektionen wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase normalisiert. Das Schaubild zeigt ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der beobachtete Repressionseffekt ist von der Anwesenheit von Gal4-Bindestellen im Promotor abhängig (Abb. 24).

HeLa-Zellen wurden mit einem Reporter gen transfiziert, das zwar den Thymidinkinasepromotor enthielt, jedoch keine Gal4-Bindestellen. Der Tk-Luziferasereporter (Position -109 bis +52) zeigt auf Grund der konstitutiven Bindung basaler Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine hohe Basalaktivität. In der als Kontrolle bezeichneten Transfektion wurde nur der Leervektor der Gal-Fusionsplasmide transfiziert. Weiterhin wurde die Gal_{DBD} und Gal-Trip6 zusammen mit dem Reporter gen transfiziert.

Die Gal_{DBD} hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Luziferaseaktivität. Durch die Expression des Gal-Trip6-Proteins wurde die Aktivität des Reporters ohne Gal4-Bindestellen nicht reprimiert. Dies läßt darauf schließen, daß für den Effekt der Repression die Lokalisation zur Promotorregion notwendig ist. Darüberhinaus beruht die Repression weder auf einer Konkurrenz des Gal-

Fusionsproteins mit dem Reporter um notwendige Koaktivatoren, noch auf einer Störung der Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Der beobachtete Repressionseffekt unter Verwendung des Gal₅-Tk-Reportergens ist demnach auf eine aktive Repressionsfunktion des Trip6-Proteins zurückzuführen.

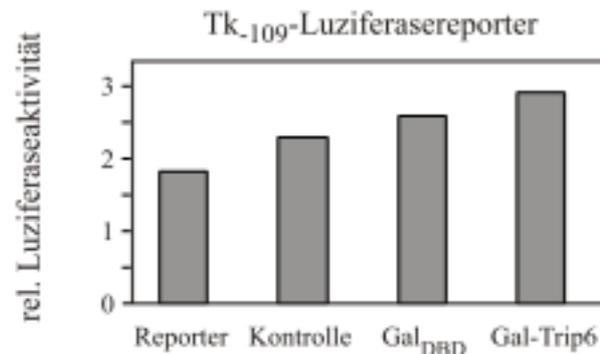


Abb. 24: Der Repressionseffekt von Trip6 ist von der Anwesenheit von Gal-Bindestellen im Reporter abhängig.

5·10⁵ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Calcium-Phosphatpräzipitation mit jeweils 1 µg eines pGL3-Tk-Luziferasereporters sowie des angegebenen Expressionsvektors transfiziert. Als Kontrolle wurde die entsprechende Menge des Leervektors (pcDNA3.1+, Kontrolle) transfiziert bzw. die Basalaktivität des Reporters ohne weitere Kotransfektion gemessen (Reporter).

3.14.2 Trip6 besitzt mindestens zwei unabhängige Repressionsdomänen

Trip6 besitzt transkriptionelle Repressorfunktion. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob sich diese Repressionsfunktion auf eine bestimmte Proteindomäne im Trip6 eingrenzen läßt.

Dieser Aspekt wurde mit Hilfe von Deletionsmutanten des Proteins analysiert. Abb. 25 zeigt eine schematische Darstellung des Trip6-Proteins und der verwendeten Deletionsmutanten.

Der prolinreiche N-Terminus ist weiß dargestellt, die drei Lim-Domänen in verschiedenen Graustufen. Die verschiedenen Konstrukte wurden nach den kodierten Aminosäuren benannt. So enthält das Konstrukt Gal-T₆₁₋₂₈₀ zum Beispiel den kompletten N-Terminus von der Aminosäure 1 bis 280 fusioniert an die Gal_{DBD}.

Wie im Abschnitt 3.14 beschrieben, wurde ein Gal₅-Tk-Luziferasereporter zusammen mit den angegebenen Gal-Fusionsproteinen transfiziert und die resultierende Reporteraktivität gemessen.

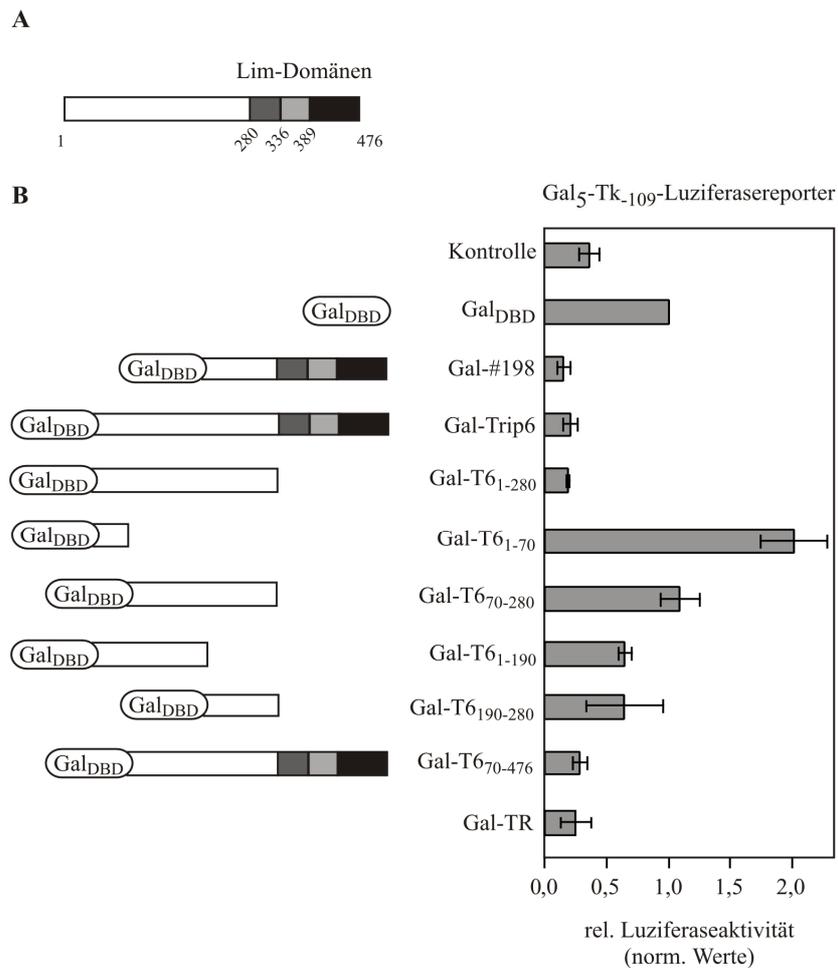


Abb. 25: Eine Repressionsdomäne von Trip6 liegt im N-Terminus.

(A) Schematische Darstellung des Trip6-Proteins. Der prolinreiche N-Terminus ist weiß dargestellt, die drei Lim-Domänen in verschiedenen Grautönen. (B) $5 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Calcium-Phosphatpräzipitation mit jeweils $1 \mu\text{g}$ eines Gal₅TK-Luziferasereporters, sowie eines Expressionsplasmids für das angegebene Fusionsprotein transfiziert. Als Kontrolle wurde die entsprechende Menge des Leervektors (pcDNA3.1+) transfiziert. Die Reporteraktivität mit der Gal_{DBD} wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Reporteraktivitäten hierauf bezogen. Als Fusionsproteine wurden Gal-#198 und Gal-Trip6 verwendet, sowie verschiedene Deletionsmutanten des N-Terminus. Die enthaltenen Aminosäuren sind durch Start- und Stopposition mit Zahlen charakterisiert und links auch schematisch dargestellt.

Das Schaubild zeigt die Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Alle Reporterogenaktivitäten wurden durch die mit der Gal_{DBD} erhaltene Reporteraktivität dividiert und die relativen Werte in einem Balkendiagramm aufgetragen (Renilla normalisiert). Die Basalaktivität des Reporters (Kontrolle) wurde durch die Gal_{DBD} um den Faktor 2,5 erhöht und durch die Trip6-Fusionen (Gal-Trip6 und Gal-#198) 8-10 fach reprimiert.

Wird der komplette N-Terminus eingesetzt (Aminosäuren 1 bis 280), so kann die Reporteraktivität im gleichen Maße reprimiert werden wie mit dem Gesamtprotein. Dies deutet darauf hin, daß der N-Terminus eine Repressionsdomäne trägt. Um diese weiter einzugrenzen, wurden weitere Deletionen hergestellt und auf ihre Repressionsfähigkeit getestet.

Die ersten 70 Aminosäuren von Trip6 (Gal-Trip6₁₋₇₀) waren nicht in der Lage den Reporter zu reprimieren, sondern resultierten im Gegenteil in einer zweifachen Aktivierung des Reportergens. Überraschenderweise hatten die Aminosäuren 70 bis 280 überhaupt keinen Effekt, die Reporterogenaktivität war hier mit der Aktivität nach Transfektion der Gal_{DBD} vergleichbar. Die Konstrukte mit den Aminosäuren 1 bis 190 bzw. 190 bis 280 (Gal-T6₁₋₁₉₀ und Gal-T6₁₉₀₋₂₈₀) zeigten nur eine Repression der Reporteraktivität auf ca. 50-60% mit der Gal_{DBD}-Werte. Diese Ergebnisse zeigen, daß der N-Terminus eine Repressionsfunktion enthält, die sich aber mit den gewählten Mutanten nicht weiter eingrenzen ließ. Teilt man den N-Terminus in zwei Teile, so sind die einzelnen Mutanten nur noch schlecht, bzw. überhaupt nicht in der Lage den Reporter zu reprimieren. Im Extremfall wird dieser sogar von den ersten 70 Aminosäuren aktiviert. Dies deutet darauf hin, daß die einzelnen Bereiche des N-Terminus in definierter Weise miteinander kooperieren. Da aus der Primärstruktur des N-Terminus mit Hilfe einer Computeranalyse keine besonderen Struktur motive abgeleitet werden konnten, ist es schwierig, die für die Repression notwendigen Domänen einzugrenzen, ohne sie zu zerstören. Die genaue Repressionsdomäne des N-Terminus konnte aus diesem Grund noch nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz zum N-Terminus besteht der C-Terminus aus drei sehr charakteristischen Struktur motiven, den Lim-Domänen. Diese dienen, wie bereits im Abschnitt 3.6 erwähnt, als wichtige Oberflächen für Protein-Protein-Interaktionen.

Durch die in Abb. 26 gezeigten Experimente wurde nun der C-Terminus von Trip6 auf seine repressorischen Eigenschaften genauer untersucht. Die angegebenen Gal-Fusionsproteine wurden

Alle Reportergergenaktivitäten wurden durch die mit der Gal_{DBD} erhaltene Reporteraktivität dividiert und die relativen Werte in einem Balkendiagramm aufgetragen (Renilla normalisiert). Der komplette C-Terminus, bestehend aus den Lim-Domänen 1 bis 3, reprimierte den Reporter noch stärker als die bisher eingesetzten Trip6-Konstrukte (Gal-Trip6 und Gal-#198). Dies deutet darauf hin, daß auch der C-Terminus eine Repressionsdomäne trägt. Um diese weiter einzugrenzen, wurden Gal-Fusionen von verschiedenen Kombinationen der Lim-Domänen oder der einzelnen Domänen selbst auf ihre Repressionsfähigkeit getestet. Die Domäne 1 und 2 zusammen zeigen nur einen schwachen Repressionseffekt, dieser ist bei der Fusion der Domänen 2 und 3 verbessert.

Die einzelnen Lim-Domänen unterscheiden sich in ihrer Repressionsfähigkeit. Die Lim-Domäne 1 zeigt den schwächsten Effekt, gefolgt von der Lim-Domäne 2, während die Lim-Domäne 3 die stärkste Repressionsfunktion zeigt.

Die Lim-Domäne 3 ist demnach die Hauptrepressionsdomäne, während die beiden anderen zwar auch noch Repression vermitteln, aber nicht in dem Ausmaß wie Lim 3. Die drei Lim-Domänen kooperieren sehr stark, da eine Fusion aller drei Domänen effizienter reprimierte als die Domänen 2 und 3 zusammen. Vermutlich bilden die drei Domänen zusammen eine Proteinoberfläche für die Interaktion mit weiteren Repressorproteinen.

Über den Mechanismus der Repression ist zur Zeit noch nichts bekannt. Vorläufige Experimente zeigen, daß ein Histondeazetylaseinhibitor, Trichostatin A, keinen Effekt auf die durch Trip6 vermittelte transkriptionelle Repressionsfunktion hat. Dies läßt darauf schließen, daß bei dem Repressionsprozeß keine Histondeazetylasen beteiligt sind.

Um sicherzugehen, daß die unterschiedlichen Repressionseffekte nicht auf einer unterschiedlichen Proteinmenge der einzelnen Konstrukte beruhen, wurden die Fusionsproteine mit Hilfe einer Western-Blotanalyse aus den gemessenen Luziferaseextrakten detektiert (Abb. 27). Die Proteinmenge des in Spur 1 geladenen Gal-Trip6 ist höher als die Menge von Gal-#198, Lim1-3, Lim1 und Lim3 (vgl. Spuren 2, 3, 5 und 7). Diese werden ungefähr gleich stark exprimiert. Die Menge von Gal-Lim2+3 ist im Vergleich dazu etwas erhöht (Spur 4), zeigt aber im Reportersystem eine schlechtere Repression als Gal-Lim1-3. Der schwächere Repressionseffekt der Lim2 kann jedoch eventuell auf eine niedrigere Proteinmenge zurückzuführen sein (Spur 6).

Die unterschiedlichen Repressionskapazitäten der verschiedenen Lim-Domänenkombinationen können, mit Ausnahme der Lim2, nicht auf Unterschiede in der Proteinmenge beruhen.

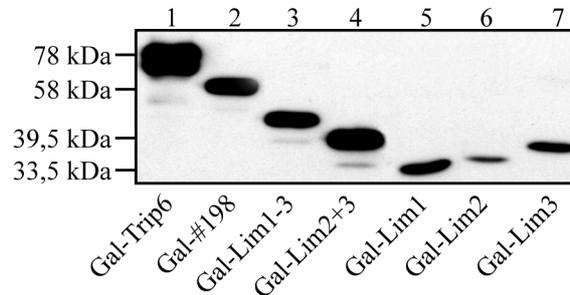


Abb. 27: Vergleich der Fusionsproteinmengen aus den einzelnen Luziferaseextrakten

Die Zellextrakte, die im Experiment der Abb. 27 zur Bestimmung der Luziferaseaktivitäten hergestellt wurden, wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das Gal-Fusionsprotein anschließend durch Western-Blotanalyse mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenantiserums gegen die Gal_{DBD} detektiert. Die jeweils transfizierten Konstrukte sind angegeben.

3.15 Herstellen einer Zelllinie mit reduzierten Trip6 Proteinmengen

Um die Rolle von Trip6 bei der Repression endogener Zielgene des Transkriptionsfaktors AP-1 zu untersuchen, sollte eine Zelllinie hergestellt werden, die kein oder nur geringe Menge an Trip6 exprimiert. Dies sollte durch eine stabile Integration des bereits für die transienten Transfektionen benutzten „antisense“-Konstruktes von Trip6 in das Genom von HeLa-Zellen erreicht werden.

Nach der Transfektion mit Hilfe der Calcium-Phosphatmethode wurden die HeLa-Zellen auf Neomycin-Resistenz selektioniert, ein Resistenzmarker der auf dem „antisense“-Vektor kodiert wurde. Die nach drei Wochen erhaltenen stabilen Klone wurden mit Hilfe der Western-Blotanalyse unter Verwendung des polyklonalen Immunsersums gegen Trip6 auf reduzierte oder nicht mehr vorhandene Trip6-Proteinexpression getestet.

Bei keinem der 50 getesteten Klone war die Proteinmenge von Trip6 beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu der Hypothese, daß Trip6 eventuell einen wichtigen Faktor für das Überleben von Zellen darstellen könnte.

Um dennoch „antisense“-Klone zu erhalten, wurde ein Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem gewählt. Bei dem verwendeten Tet-Off System kann die Expression der „antisense“-RNA durch Entzug von Tetracyclin induziert werden.

Das Tet-Off System besteht aus zwei Komponenten, einem sog. Tet-Repressor (beim Tet-Off System fusioniert an die VP16 Transaktivierungsdomäne, also eigentlich „Tet-Aktivator“) und einem Expressionsplasmid, dessen Promotor mehrere „Tetracyclin responsive Elemente“ enthält. In Anwesenheit von Tetracyclin kann der Tet-Repressor nicht an die „Tetracyclin responsiven Elemente“ in der DNA binden und die Expression des Zielgens unterbleibt, während in Abwesenheit von Tetracyclin das Tet-Repressor-VP16 Fusionsprotein an den Promotor bindet und durch die Transaktivierungsdomäne die Transkription des Zielgens induziert. In den verwendeten HeLa-Tet Off Zellen (Clontech) ist das Expressionsplasmid für das Tet-Repressor-VP16 Fusionsprotein bereits stabil ins Genom integriert.

In diese kommerzielle Zelllinie wurde das „antisense“-Trip6 Plasmid unter der Kontrolle eines Tetracyclin sensitiven Promotors durch Elektroporation transfiziert. Der Tetracyclin sensitive Promotor ist bidirektional und treibt zusätzlich ein Firefly-Luziferasereporter gen. Durch Messung der Firefly-Luziferaseaktivität nach Tetracyclin entzug können positive Klone leicht identifiziert werden. Anstelle von Tetracyclin kann auch das in Zellkultur stabilere Doxycyclin verwendet werden.

Drei der überprüften Klone (Klon α s-15, 25 und 27) zeigten eine hohe Luziferaseaktivität nach 48 h Doxycyclinentzug. Diese Klone wurden mit Hilfe der Western-Blotanalyse auf Trip6-Proteinmenge nach verschiedenen Zeiten ohne Doxycyclin getestet (Abb. 28). Hierzu wurden Gesamtzellextrakte der Klone in Anwesenheit von Doxycyclin (+) und nach 3 bzw. 9 Tagen ohne Doxycyclin hergestellt und jeweils gleiche Proteinmengen einer Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Im „antisense“-Klon 15 und 27 ist das Trip6 Protein nach neun Tagen ohne Dox nicht mehr nachweisbar, im Klon 25 ist es nach neun Tagen deutlich reduziert. Im Klon 15 und 25 verschwindet die bereits in Abb. 15 beschriebene 40 kDa-Bande (eventuell Spleißprodukt), bei Klon 27 wird diese nur leicht reduziert. Es zeigte sich, daß Trip6 eine lange Halbwertszeit hat, da die Proteinmengen nach drei Tagen Doxycyclinentzug nicht beeinträchtigt waren.

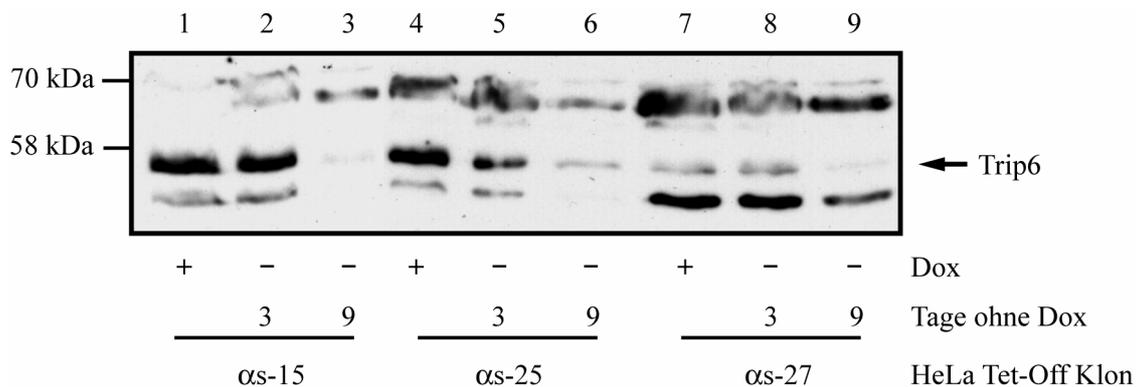


Abb. 28: Drei „antisense“-Trip6 Klone zeigen einen deutlichen Rückgang des Trip6 Proteins nach Doxycyclinentzug.

Gesamtzellextrakte der drei „antisense“-Trip6 exprimierenden stabilen Klone (α s-15, 25 und 27) wurden nach verschiedenen Zeiten des Doxycyclinentzugs (3 oder 9 Tage) hergestellt. Zum Vergleich wurden Extrakte von in Anwesenheit von Doxycyclin kultivierten Klonen geladen (+). Der Pfeil markiert das für Trip6 spezifische Signal.

Anschließend sollte überprüft werden, ob in Abwesenheit von Trip6 (Doxycyclinentzug von mindestens neun Tagen) AP-1 durch den GR noch reprimierbar ist. In einem ersten Ansatz wurde die Repression eines endogenen Gens, die Kollagenase I, untersucht. Aus bisher unbekannter Ursache haben sowohl die parentalen HeLa-Tet-Off Zellen als auch die drei „antisense“-Klone die Fähigkeit zur Kollagenaseinduktion nach TPA verloren und es konnte somit keine Repression gemessen werden.

Deshalb muß die Frage, ob Trip6 essentiell für die AP-1 Repression durch den GR ist, mit Hilfe einer transient exprimierten „antisense“-RNA von Trip6 beantwortet werden. Durch eine gezielte Analyse der transfizierten Zellen (durch Sortieren) kann dann überprüft werden, ob das Trip6-Protein nicht mehr exprimiert wird. Ist dies der Fall, so kann in den „antisense“-transfizierten Zellen die AP-1 Repression mit Hilfe eines Reportergens oder unter Verwendung des endogenen Kollagenase I Gens gemessen werden.

4 Diskussion

Der GR ist in der Lage nach Bindung seines Liganden in den Zellkern zu translozieren und dort die Genexpression in verschiedenster Weise zu beeinflussen. Zum einen bindet der GR als Homodimer an klassische GREs (engl. *glucocorticoid responsive elements*) in den Promotoren hormoninduzierbarer Gene und aktiviert die Transkription dieser Zielgene. Zum anderen ist der GR auch in der Lage die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und NF- κ B durch eine Protein-Protein Wechselwirkung zu hemmen.

Obwohl funktionelles AP-1 und der GR in vielen Zellen exprimiert werden, zeigt die AP-1 Repression durch den GR eine Zelltypspezifität (Shemshedini et al., 1991). In Hefe läßt sich AP-1 und der GR funktionell exprimieren, doch der Repressionseffekt kann nicht rekonstituiert werden. Zusammengenommen deuten diese Befunde auf eine Beteiligung weiterer Faktoren am Repressionsprozeß hin. Die Hypothese, daß die einfache GR/AP-1 Interaktion nicht ausreicht, um AP-1 Repression zu vermitteln, wurde durch eine GR-Mutante unterstützt, die in Säugetierzellen keine Hemmung der AP-1 Aktivität zeigt, aber *in vitro* noch an AP-1 binden kann (Göttlicher et al., 1996). Das Ziel dieser Arbeit war, diese zusätzlichen, AP-1 Repression vermittelnden Faktoren, zu identifizieren. Sie sollten mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens als GR interagierende Proteine identifiziert werden und anschließend funktionell auf eine Beteiligung am AP-1 Repressionsprozeß in Säugetierzellen getestet werden.

In dieser Arbeit gelang die Isolierung mehrerer bisher unbekannter Partnerproteine des GR. Eines der Isolate ist das bereits 1995 als Thyroidhormonrezeptor (TR) interagierendes Protein identifizierte Trip6. Die in meiner Arbeit präsentierten Ergebnisse machen eine Beteiligung des Trip6-Proteins an der GR-abhängigen Repression der AP-1 Aktivität sehr wahrscheinlich. Damit trägt die Arbeit nicht nur zu einem detaillierteren mechanistischen Verständnis der GR-abhängigen Transrepression bei, sondern definiert auch eine neue Klasse von Kofaktoren des GR.

4.1 GR_{mH12ΔAF-1} ist eine geeignete Mutante für den Einsatz im Two-Hybrid Screen

Voraussetzung für die Durchführung eines Two-Hybrid Screens ist, daß das Zielprotein selbst keine transaktivierenden Eigenschaften besitzt.

Die bisher in der Literatur beschriebene GR-Mutante, die zwischen der Transaktivierung und Transrepression dissoziiert, konnte als Zielprotein nicht eingesetzt werden.

Die GR_{dim}-Mutante trägt eine Punktmutation in einem für die Dimerisierung notwendigen Bereich der DNA-Bindedomäne. Sie kann durch ausbleibende Dimerisierung in Säugetierzellen nicht mehr transaktivieren. Da jedoch beide Transaktivierungsdomänen intakt sind, ist diese Mutante als Gal4-Fusionsprotein im Hefesystem nicht einsatzfähig.

Aus diesem Grund war es notwendig eine GR-Mutante herzustellen, die keine Transaktivierung mehr zeigt. Die Repressionskapazität sollte nicht eingeschränkt sein, damit potentielle Kofaktoren der Repression noch an die Mutante binden können.

Diese Mutante GR_{mH12} trägt eine Punktmutation in der Helix 12 der Ligandenbindedomäne, eine Aminosäureposition die für die Stabilisierung der intramolekularen Umlagerungen des Rezeptors nach Ligandenbindung verantwortlich ist. Durch die Umlagerung werden neue Proteinoberflächen für die Koaktivatorinteraktion gebildet (Renaud et al., 1995). In der verwendeten Mutante wurde zusätzlich die N-terminale Transaktivierungsfunktion AF-1 deletiert. Es ergab sich somit eine transkriptionell inaktive Rezeptormutante, die aber in ihrem Repressionspotential nicht eingeschränkt war (Abschnitt 3.1). Somit war die Mutante GR_{mH12ΔAF-1} eine ideale Mutante für den Einsatz in einem Two-Hybrid Screen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Two-Hybrid Screens, bei denen nur kleine Teilbereiche des GR verwendet wurden, konnte nun erstmals ein großer zusammenhängender und funktioneller Bereich des Proteins für die Suche nach neuen Interaktionspartnern eingesetzt werden (Aminosäure 262 bis 777).

Trip6 wurde im Rahmen eines früheren Two-Hybrid Screens, bei dem es als TR interagierendes Protein identifiziert wurde (Lee et al., 1995), auch auf eine potentielle Interaktion mit dem GR getestet. Der hierzu verwendete Bereich des GR umfaßte die Aminosäuren 481 bis 777 und zeigte

keine Interaktion mit Trip6. Demnach interagiert Trip6 in dem Bereich zwischen der N-terminalen Transaktivierungsfunktion AF-1 und der DNA-Bindedomäne des GR.

Für die AP-1 Repression ist die DBD des Rezeptors und Bereiche des N-Terminus und C-Terminus des GR notwendig (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Kerpolla et al., 1993). Anhand der verwendeten GR Mutante GR_{mH12ΔAF-1} zeigte sich nun, daß die Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 bei der AP-1 Repression nicht beteiligt sind.

4.2 Neue Interaktionspartner des GR

Für den Two-Hybrid Screen wurde die gerichtete humane HeLa cDNA-Genbank (Clontech) verwendet, mit $6 \cdot 10^6$ unabhängigen Klonen und einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 1,5 kb (0,4-2,0 kb).

Das Hauptinteresse des Screens lag in der Identifikation von neuen, an der AP-1 Repression beteiligten Partnerproteinen des GR. Potentielle Kandidaten hierfür sollten mit dem GR_{mH12ΔAF-1} hormonabhängig interagieren und keine Interaktion mit einer GR-Mutante zeigen, die AP-1 nicht mehr reprimieren kann. Diese Mutante GR_{mDBD} trägt zwei Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne (C476W und R479Q) die erwartungsgemäß die DNA-Bindung und Transaktivierung verhindern, aber zunächst unerwartet auch die Transrepression beeinflussten (Heck et al., 1994). *In vitro* ist die Mutante allerdings noch in der Lage, mit AP-1 zu interagieren, was zu der Hypothese führte, daß der direkte Kontakt von GR und AP-1 nicht ausreichend ist um AP-1 Repression zu vermitteln.

Viele Isolate des Screens zeigten nur eine schwach-hormonabhängige Assoziation mit GR_{mH12ΔAF-1} und interagierten auch mit der GR-Mutante GR_{mDBD} (siehe Abschnitt 3.4 und 3.5). Diese Proteine sind vermutlich nicht am AP-1 Repressionsprozeß beteiligt. Sie sind jedoch neue Partnerproteine des GR und könnten bei anderen Rezeptorfunktionen eine Rolle spielen. Die inhibitorische Proteasomenuntereinheit hPI31 und das Ubiquitin konjugierende Enzym Ubc9 könnten z.B. in der Degradation des Rezeptors involviert sein. Für Ubc9 wurde zusätzlich eine Funktion als

Koaktivator von p53 und des Androgenrezeptors publiziert (Firestein und Feuerstein, 1998; Poukka et al., 1999; Rodrigues et al., 1999).

Potentiell interessante Isolate hinsichtlich AP-1 Repression waren das GU/RH-II-bindende Protein und Trip6. Beide zeigten eine starke, hormonabhängige Interaktion mit GR_{mH12ΔAF-1} und interagierten mit der GR_{mDBD} nicht mehr.

Das Gu/RH-II-bindende Protein wurde erstmals mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens als Partnerprotein der GU/RNA-Helikase II identifiziert (Valdez et al., 1997). Diese RNA-Helikase gehört zu der DEAD-Box Proteinfamilie und enthält einen ATP-abhängige RNA-Helikasefunktion.

Über die Funktion sowohl der GU/RNA-Helikase II als auch des Gu/RH-II-bindenden Proteins ist zur Zeit noch nichts bekannt. Seit kürzlich jedoch ein RNA-Molekül als Koaktivator der Transaktivierungsfunktion AF-1 von Steroidhormonrezeptoren und Teil des SRC1 Komplexes isoliert wurde (Lanz et al., 1999), wird nun auch über die potentielle Beteiligung von RNA-modifizierenden Enzymen an der Transkriptionsregulation spekuliert. In diesem Zusammenhang wäre es in Zukunft interessant, die Rolle des GU/RH-II-bindenden Protein bzw. der GU/RNA-Helikase im Bezug auf Transkriptionsregulation durch den GR genauer zu untersuchen.

Das zweite interessante Isolat, Trip6 wurde erstmals als **Thyroid-Rezeptor interagierendes Proteins** ebenfalls durch einen Two-Hybrid Screen identifiziert (Lee et al., 1995). Zusätzlich zeigte Trip6 mit dem Retinsäurerezeptor RXR eine hormonabhängige Interaktion. In einem weiteren Two-Hybrid Screen wurde Trip6 als Partnerprotein eines Oberflächenproteins (Opa) von *Neisseria gonorrhoeae* isoliert, das bei der Adhäsion an und Invasion der Bakterien in humane Zellen beteiligt ist (Williams et al, 1998).

Da Trip6 bereits als Interaktionspartner zweier nukleärer Rezeptoren (TR und RXR) identifiziert wurde, und diese Rezeptoren beide in der Lage sind AP-1 zu reprimieren, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit Trip6 auf seine potentielle Beteiligung am AP-1 Repressionsprozeß näher untersucht.

Trip6 besteht aus 476 Aminosäuren und besitzt im C-Terminus drei Lim-Domänen. Lim-Domänen sind eine besondere Form eines doppelten Zinkfingermotivs (siehe Abschnitt 3.6). Sie dienen in verschiedensten Proteinen als Oberflächenmodule für Protein-Proteinwechselwirkungen (zur Übersicht Dawid et al., 1998). Der N-Terminus ist extrem prolinreich (20%), zeigt jedoch keine charakteristischen Struktur motive.

Trip6 zeigt in den Lim-Domänen eine hohe Homologie (55% Aminosäureidentität) zu Zyxin, einem Phosphoprotein, daß entlang von Aktinfilamenten und in Focalkontakten (Kontaktstellen mit der extrazellulären Matrix und/oder anderen Zellen) exprimiert wird. Über die Funktion von Zyxin ist noch nichts bekannt, es wird jedoch spekuliert, daß es als Signalüberträger zwischen dem Zytoskelett und dem Zellkern dienen kann (Macalma et al., 1996).

4.3 Trip6 ist ein nukleäres Protein und tritt in verschiedenen Spleißformen auf

Zellfraktionierungen und direkte Immunofluoreszenzfärbung sowohl des endogenen als auch zweier ektopisch exprimierter Epitop-markierter Trip6-Fusionen zeigten eine vorwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins in Cos7 (siehe Abschnitt 3.10) und HeLa-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Gegensatz zu der kürzlich publizierte Lokalisation des murinen Trip6 in embryonalen Hühnerfibroblasten (Wang et al., 1999). Hier zeigt die Flag-Trip6-Überexpression eine Lokalisation in Focalkontakten und entlang von Aktinfilamenten. Erst nach Deletion der ersten 115 Aminosäuren läßt sich das Protein verstärkt im Kern nachweisen (Wang et al., 1999). Ob die unterschiedliche Lokalisation an den verwendeten Zellsystemen liegt, oder durch Sequenzunterschiede des murinen und humanen Trip6 verursacht werden (75% Homologie im N-Terminus), ist bisher noch nicht geklärt.

Das längste Two-Hybrid Isolat von Trip6, der Klon#198 umfaßte Teile des N-Terminus und den kompletten C-Terminus des Proteins. Da in der Datenbank nur eine Form von Trip6 publiziert war, wurde davon ausgegangen, daß sich durch die Datenbanksequenz der durch den Two-Hybrid Screen erhaltene Teilbereich vervollständigen läßt. Nach Klonierung der kompletten cDNA aus

HeLa-RNA zeigte sich, daß Trip6 in mehreren Spleißformen existiert (siehe Abschnitt 3.7). Die Varianten sind im C-Terminus in den drei Lim-Domänen konserviert und variieren im N-Terminus. Die cDNAs der alternativen Varianten sind am 5'Ende noch nicht komplett, was sich aus der Abwesenheit eines Start-Codons ATG mit davorliegenden „in frame“ Stop-Codons schließen läßt.

Für alle weiteren Experimente wurde die Variante 1 verwendet, die der publizierten Datenbanksequenz entspricht, weil sie die einzige bisher komplette cDNA darstellt. Die anderen Spleißformen wurden bisher nicht auf ihre Funktion getestet. Es kann daher nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die Variante 1 diejenige Spleißform des Proteins ist, die AP-1 Repression vermittelt. Vermutlich werden alle Spleißformen mit GR interagieren können, da die Lim-Domänen als Interaktionsoberfläche für den GR bei allen Spleißformen konserviert sind. Dennoch könnten die Spleißformen unterschiedliche Funktionen am Rezeptor ausüben.

Durch Überexpression von Epitopmarkierten Spleißvarianten in Zellen könnten die einzelnen Spleißformen auf ihre Beteiligung hinsichtlich Transaktivierung und Transrepression durch den GR detaillierter untersucht werden.

4.4 Trip6 ist ein Kofaktor des GR und ist an der Transaktivierungs- und an der Transrepressionsfunktion beteiligt

Das Hauptinteresse des Two-Hybrid Screens war, neue Partnerproteine des GR zu identifizieren, die bei der Transrepression von AP-1 eine Rolle spielen. Deshalb wurde Trip6 auf seine Beteiligung bei der AP-1 Repression in Säugerzellen untersucht.

Überexpression des gesamten Trip6-Proteins führte nicht zu einer Verbesserung der AP-1 Repression (Daten nicht gezeigt).

Ein Grund hierfür könnte sein, daß Trip6 in nicht limitierender Menge in der Zelle vorliegt. Es könnte auch sein, daß die überexprimierte Spleißform (Variante 1) beim Repressionsprozeß nicht beteiligt ist und eine andere Spleißform für den Prozeß limitierend ist.

Die Überexpression eines Teilbereichs des Protein (Aminosäure 190 bis 476) hatte keine dominant negative Wirkung auf die beiden GR-Funktionen. Dies ist nicht verwunderlich, da sich

anschließend zeigte, daß die GR- und AP-1 Interaktionsoberfläche, sowie die Repressionsfunktion des Proteins in dem eingesetzten Fragment enthalten waren.

Die Erniedrigung der Proteinmenge durch die Expression einer „antisense“ RNA führte allerdings zu einer Verschlechterung der AP-1 Repression (siehe Abschnitt 3.8). Dies deutet darauf hin, daß Trip6 einen essentiellen Faktor für die AP-1 Repression darstellt.

Durch die Erniedrigung der Proteinmenge von Trip6 wurde auch das Transaktivierungspotential des GR mehr als verdoppelt. Somit scheint Trip6 ein Kofaktor des GR zu sein, der nicht nur bei der AP-1 Repression durch den GR eine zentrale Rolle spielt, sondern auch bei der Transaktivierung durch den GR negativ regulierend eingreift.

Das verwendete „antisense“-Konstrukt umfaßt den bei allen Spleißformen konservierten C-Terminus, und sollte somit zu einer Reduktion aller Spleißformen des Proteins führen.

Der Nachteil des transienten „antisense“ Experiments lag darin, daß die Reduktion der Trip6 Proteinmenge durch das „antisense“-Konstrukt nicht gezeigt werden konnte.

Aus diesem Grund wurde der Ansatz der stabilen Integration einer durch Tetracyclin induzierbaren „antisense“- RNA in HeLa-Zellen gewählt (das verwendete Konstrukt entsprach dem, in den transienten Transfektionen eingesetzten „antisense“-Konstrukts, siehe Abschnitt 3.15). Somit konnten Zelllinien hergestellt werden die nach Induktion der „antisense“-RNA nur noch reduzierte Mengen oder kein Trip6 mehr exprimierten. Dies zeigt eindeutig, daß die verwendeten „antisense“-Konstrukte in der Zelle die gewünschte Wirkung haben. Mit Hilfe dieser stabilen Klone können nun viele, noch offene Fragen adressiert werden, z.B kann AP-1 und NF- κ B in Abwesenheit von Trip6 noch reprimiert werden? Spielt Trip6 auch bei der AP-1 Repression durch TR und RXR eine Rolle?

Erste Ergebnisse der „antisense“-Klone zeigen, daß Trip6 eine sehr hohe Halbwertszeit besitzt, da das Protein erst nach 4-5 Tagen in der Menge reduziert wird und erst nach 9 Tagen nicht mehr oder nur noch schwach nachweisbar ist. Diese hohe Stabilität des Proteins könnte auch ein Grund sein, weshalb das transiente „antisense“-Experiment nur eine teilweise Hemmung der AP-1 Repression erbrachte. In diesem Experiment wurde die AP-1 Repression vier Tage nach der

transienten Transfektion des „antisense“-Konstruktes gemessen, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Expression des Proteins noch nicht drastisch vermindert ist.

Unglücklicherweise haben die stabilen „antisense“-Klone die Fähigkeit zur Kollagenase I Induktion nach TPA verloren. Somit kann die AP-1 Repression durch den GR anhand dieses endogenen Gens nicht mehr analysiert werden.

Im Moment werden weitere endogene AP-1 Zielgene, die durch den GR reprimiert werden, hinsichtlich einer Beeinträchtigung der AP-1 Repression in Abwesenheit von Trip6 untersucht (z.B. Stromelysin). Zusätzlich wird diese Fragestellung auch durch den Einsatz von geeigneten Reportergenen adressiert. Ist dieser Ansatz nicht erfolgreich, so können die noch offenen Fragen auch mit Hilfe von transient transfizierten und anschließend sortierten Zellen untersucht werden.

Anschließend wird auch die NF- κ B Repression durch den GR in Abwesenheit von Trip6 mit Hilfe endogener Gene oder Reportergenkonstrukten analysiert werden. Zeigt sich, daß Trip6 auch bei der NF- κ B Repression eine essentielle Rolle spielt, so stellt Trip6 einen generellen Mechanismus der Repression durch Protein-Protein-Wechselwirkungen des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren dar.

4.5 Führt die Interaktion von Trip6 mit GR und AP-1 (bzw. NF- κ B) zur Ausbildung eines ternären Komplexes?

Das Antisense-Experiment zeigte eine Beteiligung von Trip6 an der AP-1 Repression. Da diese vermutlich durch eine Protein-Protein-Wechselwirkung von GR und AP-1 vermittelt wird, stellte sich die Frage, ob Trip6 eventuell auch direkt mit AP-1 interagieren kann.

Durch einen *in vitro* GST-Interaktionstest konnte eine spezifische Interaktion von Trip6 mit der AP-1 Komponente cFos nachgewiesen werden, nicht jedoch mit cJun (siehe Abschnitte 3.12 und 3.13). Weitere Mitglieder der Jun/Fos-Familie wurden bisher nicht auf ihre potentielle Interaktion mit Trip6 getestet.

Aus diesen Interaktionsdaten ergibt sich das einfache Modell, daß Trip6 zusammen mit GR und AP-1 (vermittelt über cFos) einen ternären Komplex bildet.

Eine Möglichkeit wäre, daß Trip6 mit dem hormonbeladen monomeren GR interagiert und somit vom GR an AP-1 gebracht wird. Für diese Hypothese spricht, daß Trip6 auch das Transaktivierungspotential des Rezeptors erniedrigt (siehe Abschnitt 3.8). Somit scheint Trip6 ein negativ regulierender Faktor des GR zu sein. Es ist im folgenden noch zu klären, ob Trip6 nur mit dem monomeren GR interagiert (und eventuell die Dimerisierung verhindert) oder ob Trip6 auch nach Dimerisierung zweier GR-Moleküle im Komplex vorhanden ist. Trip6 könnte einen stabilisierenden Faktor darstellen oder ein Brückenprotein, welches die Interaktion von GR mit AP-1 vermittelt. Dies würde auch erklären, weshalb die direkte Interaktion von AP-1 und GR *in vivo* oder *in vitro* von vielen Arbeitsgruppen bisher nicht überzeugend nachgewiesen werden konnte. Da sich Trip6 nur sehr schwer aus dem Zellkern extrahieren läßt, könnte es sein, daß unter den bisher gewählten Bedingungen, Trip6 nicht in dem, zur Koimmunopräzipitation eingesetzten Lysat vorhanden war.

GR ist auch in der Lage mit der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B zu interferieren. Hierfür wurden als Mechanismus u.a. die Hemmung durch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen GR und NF- κ B (RelA-Untereinheit p65 und p50) als Ursache der Repression postuliert. Wird NF- κ B Repression genauso wie AP-1 Repression durch Protein-Protein Wechselwirkung mit dem GR vermittelt, so stellte sich die Frage, ob Trip6 eventuell auch an diesem Proteinkomplex beteiligt ist und ein genereller Faktor dieses Repressionstyps darstellt.

Es zeigte sich eine deutliche *in vitro* Interaktion von RelA mit Trip6, die kürzlich auch durch eine andere Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens entdeckt wurde (Zhao et al., 1999).

Durch Kartieren der einzelnen Interaktionsoberflächen auf Trip6, GR und Fos (und p65) läßt sich die Frage, ob Trip6 als Brückenprotein fungieren kann, eventuell beantworten.

Die Existenz der postulierten ternären Komplexe zwischen GR, Trip6 und AP-1 bzw. NF- κ B muß durch Koimmunopräzipitationen *in vivo* nachgewiesen werden. Desweiteren würden Trip6 Mutanten, die selektiv die Fähigkeit zur Interaktion mit GR oder mit Fos bzw. NF- κ B verloren haben, zeigen, welchen Stellenwert die Ausbildung des ternären Komplexes für den beobachteten Repressionseffekt hat. Interaktionsdefiziente Mutanten von Trip6 könnten eine dominant negative Wirkung auf die AP-1 Repression ausüben.

4.6 Trip6 hat transkriptionelle Repressorfunktion

Wie interferiert der GR/Trip6 Komplex mit der Transaktivierungsfunktion von AP-1 oder NF- κ B?

Hier gibt es zumindest drei mögliche Mechanismen (zur Übersicht Johnson 1995; Lefstin und Yamamoto, 1998):

1. GR zusammen mit Trip6 könnte mit AP-1 bzw. NF- κ B um gemeinsame Koaktivatoren konkurrieren und AP-1 dadurch in seiner Aktivität hemmen.

Falls GR zusammen mit Trip6 verstärkt mit Koaktivatoren für GR bzw. AP-1 (wie beispielsweise CBP) interagiert, sollte die Reduktion der Trip6-Proteinmenge, durch die Expression eines „antisense“-Konstrukts, die Transaktivierungsfunktion des GR hemmen. Es wurde jedoch eine Erhöhung des Transaktivierungspotentials des GR beobachtet (siehe Abschnitt 3.8).

Die Überexpression von Trip6 sollte in diesem Modell zu einer verstärkten Repression führen, was jedoch nicht der Fall war. Deshalb ist nicht anzunehmen, daß es zu einer stärkeren Assoziation von Kofaktoren an den GR/Trip6-Komplex kommt, die dadurch für AP-1 oder NF- κ B limitierend werden könnten.

2. Das Protein könnte durch die Interaktion mit AP-1 bzw. NF- κ B wichtige Proteinoberflächen blockieren, die normalerweise für die Bindung von Koaktivatoren notwendig sind.

Diese Frage läßt sich erst nach genauer Kartierung aller involvierten Proteinoberflächen beantworten.

3. Trip6 könnte selbst eine Repressorfunktion tragen und beispielsweise durch Interaktion mit chromatinmodifizierenden Faktoren oder durch Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie die Transkription reprimieren.

Bei den chromatinmodifizierenden Faktoren sind häufig Enzymaktivitäten beteiligt, die mit dem Azetylierungs- oder Methylierungsstatus des Chromatins interferieren. Die bekanntesten

Korepressoren dieser Gruppe sind N-CoR/Smart, die mit dem nicht-liganden gebundenen TR und RXR interagieren und durch die zusätzliche Interaktion mit Sin3 Histon-Deazetylasen rekrutieren (Hörlein et al., 1995; Alland et al., 1997; Heinzl et al., 1997). Histon-Deazetylasen entfernen Azetylreste an Histonen und führen dadurch zu einer geschlossenen Chromatinstruktur (zur Übersicht Wade und Wolffe, 1997; Ashraf und Ip, 1998). Auch Methylierung ist eine Modifikation des Chromatins, die zur Repression der Transkription führt. Die Proteine MeCP1 und 2 binden an methylierte DNA und rekrutieren ebenfalls über Sin3 Histon-Deazetylasen an die DNA (Meehan et al., 1989; Nan et al., 1997; Jones et al., 1998).

Eine andere Art der Repression umfaßt keine Enzymaktivitäten, sondern resultiert aus Proteininteraktionen mit den Histonen oder Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Die Repressoren Sir3, Sir 4, Tup1 und Groucho interagieren direkt mit den Histonen H3 und H4 und halten somit das Chromatin geschlossen (Paroush et al., 1994; Hecht et al., 1995; Edmondson et al., 1996; Palaparti et al., 1997). Der Dr1/Drap1-Komplex und Not1 vermitteln Repression durch Bindung an das TATA-Box bindene Protein (TBP) und verhindert dadurch die Assoziation von TFIIB (Kim et al., 1997; Lee et al., 1998). Der Repressor Mot1 verdrängt TBP von der DNA (zur Übersicht Hampsey et al., 1998). In beiden Fällen kann sich der Prä-Initiationskomplex nicht ausbilden und die Transkription unterbleibt.

Um die transkriptionellen Eigenschaften eines Proteins zu untersuchen, kann das Protein an eine heterologe DNA-Bindedomäne (z.B. Gal4) fusioniert werden. Besitzt das Protein Transaktivierungsdomänen, so läßt sich dies als gesteigerte Transkription eines Gal4-abhängigen Reportergens messen. Ist das Protein ein autonomer transkriptioneller Repressor, so wird die Basalaktivität des Gal4-abhängigen Reporters gehemmt.

In diesem experimentellen System ist Trip6 in der Lage die Transkription des Gal-Reporters ca. 10 fach zu reprimieren und ist demnach ein effektiver Repressor der Transkription. Die Lim-Domänen von Trip6 zeigten die volle Repressionskapazität vergleichbar der des Gesamtproteins. Die isolierte Lim-Domäne drei zeigte ebenfalls eine 10-fache Repression des Gal-Reporters.

Trip6 war ebenso effizient wie eine als Kontrolle verwendete Gal-Fusion des Thyroidhormonrezeptors (TR). Der nicht-ligandengebundene TR bindet an den Korepressor N-

CoR (Hörlein et al., 1995), der Histondeazetylasen rekrutiert und somit im Gal-System mit der Transkription des Reportergens interferiert (Alland et al., 1997; Heinz et al., 1997).

4.7 Modell: Trip6 bringt seine transkriptionelle Repressorfunktion durch Ausbildung eines ternären Komplexes an AP-1

Trip6 wird vermutlich vom ligandengebundenen GR an AP-1 gebracht. Durch die Interaktion mit Fos bildet sich ein ternärer Komplex zwischen AP-1, GR und Trip6 aus. Mit Hilfe der transkriptionellen Repressorfunktion, die Trip6 mitbringt kann nun erklärt werden, weshalb dieser ternäre Komplex transkriptionell inaktiv ist. Durch die Ausbildung des ternären Komplexes wird Trip6 über AP-1 indirekt an die DNA gebunden (vergleichbar zu der Bindung an die DNA mit Hilfe der Gal4DBD) und lokalisiert somit seine Repressorfunktion in die direkte Umgebung von AP-1.

Was ist der Mechanismus der Repressorfunktion von Trip6? Trip6 könnte selbst enzymatische Aktivitäten besitzen, die den Chromatinstatus verändern. Beispiele hierfür sind die enzymatischen Aktivitäten von Histon-Deazetylasen oder DNA-methylierenden Enzymen. Auch der Phosphorylierungsstatus der Histone spielt bei der Transkriptionsaktivierung eine Rolle (Pruss et al. 1996; Wolffe et al., 1997). Durch die Phosphorylierung der Linkerhistone H1 wird die elektrostatische Interaktion mit der DNA geschwächt, was zu einer offenen Chromatinstruktur führt. Die Dephosphorylierung der Linkerhistone kehrt diesen Effekt um (Clark et al., 1988; Hill et al., 1991; Szilak et al., 1997).

Trip6 könnte diese enzymatischen Aktivitäten selbst tragen oder über seine Lim-Domänen die entsprechenden Faktoren rekrutieren.

Das Rekrutieren zusätzlicher Proteine scheint das wahrscheinlichere Modell. Lim-Domänen kommen in einer Reihe von Proteinen vor, wie z.B. in Homeobox-Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Faktoren die mit dem Cytoskelett assoziiert sind. Sie dienen in allen bisher identifizierten Lim-Proteinen als Oberflächen für die Interaktion mit anderen Proteinen (Breen et

al., 1997; zur Übersicht Dawid et al., 1998). Eine enzymatische Aktivität wurde für die Lim-Domänen bisher noch nicht beschrieben.

Die Lim-Domäne drei zeigte die volle Repressionskapazität wie das gesamte Protein. Es ist daher anzunehmen, daß der Kontakt zu zusätzlichen Proteinen durch die Lim3 vermittelt wird.

Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Repressionswirkung von Trip6 durch den Histon-Deazetylaseinhibitor TSA nicht aufgehoben werden kann. Trip6 scheint somit nicht zu der Klasse Korepressoren zu gehören, die ihre Funktion über Histon-Deazetylasen vermitteln. Alle bisher bekannten Korepressoren der Steroidhormonrezeptoren wirken durch die Rekrutierung von Histon-Deazetylasen (z.B. N-CoR/SMART für den Thyroidhormonrezeptor TR und den Retinsäurerezeptor RXR).

Trip6 könnte zu der zweiten Klasse von Repressoren gehören, die ihre Repressorfunktion durch den direkten Kontakt mit der Transkriptionsmaschinerie (z.B. durch Bindung an TBP oder an die Histone H3 und H4) ausüben oder den Phosphorylierungsstatus von Histon H1 verändern. Auch für dieses Modell gilt, daß Trip6 die Interaktionen nicht selbst durchführen muß, sondern daß entsprechende Faktoren über die Lim-Domänen rekrutiert werden könnten.

Trip6 könnte die AP-1 Repression auch durch einen bisher unbekanntem Mechanismus der transkriptionellen Repression vermitteln. In jedem Fall stellt Trip6 eine neue Klasse von Korepressoren der Steroidhormonrezeptoren dar.

Zukünftig sollte die Beteiligung von Trip6 an der NF- κ B Repression durch den GR näher untersucht werden. Eventuell ist Trip6 auch bei dieser Form der Repression essentiell und bildet einen generellen Mechanismus der Repression des GR über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. Die *in vivo* Funktion des Trip6 Proteins sollte in jedem Fall durch die Herstellung von sog. "knock-out" Mäusen analysiert werden. Es ist dabei zu überlegen, ob gezielt bestimmte Spleißformen von Trip6 oder ob die ganze Genfamilie inaktiviert wird. Diese "knock-out" Mäuse bieten mit Sicherheit wertvolle Einblicke in die Wirkungsweise des GR und dessen Transkriptionskontrolle allgemein.

4.8 Physiologische Bedeutung

Basierend auf ihrer Fähigkeit zur physiologischen Regulation der Immunfunktionen des menschlichen Körpers sind Glukokortikoide sehr wirksame antiinflammatorische und immunsuppressive Substanzen. Ihre therapeutische Anwendung wird jedoch durch schwere Nebenwirkungen begrenzt, die vor allem nach Langzeitanwendungen auftreten.

Ist die Interaktion des GR mit Trip6 tatsächlich der molekulare Mechanismus über den der GR die AP-1 und die NF- κ B Aktivität hemmen kann, so bietet dieses Molekül einen potentiellen Ansatzpunkt zur Entwicklung gezielter und somit eventuell besser verträglicherer antiinflammatorischer und immunsuppressiver Medikamente.

5 Literatur

- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7, 2256-66.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-39.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T., and Karin, M. (1988). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332, 166-71.
- Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 129-57.
- Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* 77, 799-800.
- Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370, 226-9.
- Ashraf, S. I., and Ip, Y. T. (1998). Transcriptional control: repression by local chromatin modification. *Curr Biol* 8, R683-6.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-90.
- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8832-6.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-3.

- Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene 11*, 2509-14.
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Colch) 94*, 557-72.
- Barnes, P. J., and Adcock, I. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci 14*, 436-41.
- Barnes, P. J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med 336*, 1066-71.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell 56*, 335-44.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell 83*, 851-7.
- Beckerle, M. C. (1997). Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays 19*, 949-57.
- Berger, S. L. (1999). Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr Opin Cell Biol 11*, 336-41.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K., and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science 238*, 1386-92.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature 375*, 377-82.
- Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Stroka, D., Soares, M., Bach, F. H., and Winkler, H. (1996). Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem 271*, 19612-6.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci 24*, 136-41.
- Burcin, M., Kohne, A. C., Runge, D., Steiner, C., and Renkawitz, R. (1994). Factors influencing nuclear receptors in transcriptional repression. *Semin Cancer Biol 5*, 337-46.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J. M., and Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev 11*, 3351-64.

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, 401-12.

Carlstedt-Duke, J., Stromstedt, P. E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J. A., and Jornvall, H. (1988). Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 263, 6842-6.

Cato, A. C., Ponta, H., and Herrlich, P. (1992). Regulation of gene expression by steroid hormones. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 43, 1-36.

Cato, A. C., and Wade, E. (1996). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 18, 371-8.

Celeste, A. J., Rosen, V., Buecker, J. L., Kriz, R., Wang, E. A., and Wozney, J. M. (1986). Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *Embo J* 5, 1885-90.

Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chiba, H., Muramatsu, M., Nomoto, A., and Kato, H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res* 22, 1815-20.

Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-9.

Clark, D. J., Hill, C. S., Martin, S. R., and Thomas, J. O. (1988). Alpha-helix in the carboxy-terminal domains of histones H1 and H5. *Embo J* 7, 69-75.

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

Crawford, A. W., and Beckerle, M. C. (1991). Purification and characterization of zyxin, an 82,000-dalton component of adherens junctions. *J Biol Chem* 266, 5847-53.

- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J. A., and Carlstedt-Duke, J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem* 266, 3107-12.
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., and Parker, M. G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11, 1025-33.
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J., and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12, 3343-56.
- Dawid, I. B., Breen, J. J., and Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14, 156-62.
- De Bosscher, K., Schmitz, M. L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., and Haegeman, G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13504-9.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., and Haegeman, G. (2000). Glucocorticoids repress NF-kappa B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3919-24.
- DeFranco, D. B., Ramakrishnan, C., and Tang, Y. (1998). Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 51-8.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-37.
- Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., and Yamamoto, K. R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-72.
- Dittmar, K. D., Demady, D. R., Stancato, L. F., Krishna, P., and Pratt, W. B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. *J Biol Chem* 272, 21213-20.
- Dumont, A., Hehner, S. P., Schmitz, M. L., Gustafsson, J. A., Liden, J., Okret, S., van der Saag, P. T., Wissink, S., van der Burg, B., Herrlich, P., Haegeman, G., De Bosscher, K., and Fiers, W. (1998). Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trends Biochem Sci* 23, 233-5.

- Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B., and Livingston, D. M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8, 869-84.
- Edmondson, D. G., Smith, M. M., and Roth, S. Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* 10, 1247-59.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-95.
- Fehlig, P., Baxter, J.D., Broadus, A.E. and Frohman, L.A. (1987). *Endocrinology and Metabolism* (New York: McGraw-Hill, Inc.)
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286-92.
- Firestein, R., and Feuerstein, N. (1998). Association of activating transcription factor 2 (ATF2) with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. Implication of the ubiquitin/proteasome pathway in regulation of ATF2 in T cells. *J Biol Chem* 273, 5892-902.
- Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B., and Yamamoto, K. R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334, 543-6.
- Fryer, C. J., and Archer, T. K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.
- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15, 391-407.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41.
- Göttlicher, M., Heck, S., Doucas, V., Wade, E., Kullmann, M., Cato, A. C., Evans, R. M., and Herrlich, P. (1996). Interaction of the Ubc9 human homologue with c-Jun and with the glucocorticoid receptor. *Steroids* 61, 257-62.
- Green, S., and Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 4, 309-14.

- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503.
- Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J. A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-60.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583-92.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P., and Cato, A. C. (1997). I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J* 16, 4698-707.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P., and Cato, A. C. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J* 13, 4087-95.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-6.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-8.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-48.
- Hill, C. S., Rimmer, J. M., Green, B. N., Finch, J. T., and Thomas, J. O. (1991). Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs. *Embo J* 10, 1939-48.
- Hollenberg, S. M., and Evans, R. M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M. J., and Stallcup, M. R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17, 2735-44.

- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L., and Stallcup, M. R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 4948-52.
- Hope, I. A., and Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* *46*, 885-94.
- Hörlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397-404.
- Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S., and Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* *10*, 1167-77.
- Ing, N. H., Beekman, J. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1992). Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* *267*, 17617-23.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* *79*, 107-17.
- Jantzen, H. M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., and Schutz, G. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* *49*, 29-38.
- Johnson, A. D. (1995). The price of repression. *Cell* *81*, 655-8.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* *62*, 1189-204.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* *19*, 187-91.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* *85*, 403-14.
- Kang, K. I., Meng, X., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., Chadli, A., Cadepond, F., Baulieu, E. E., and Catelli, M. G. (1999). The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 1439-44.

- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R. I., Krauter, P., Westphal, H. M., and Beato, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308, 513-9.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-6.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-6.
- Karin, M. and Saatchiouglu, 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.
- Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.
- Kerppola, T. K., Luk, D., and Curran, T. (1993). Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol* 13, 3782-91.
- Kim, S., Na, J. G., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1997). The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 820-5.
- Konig, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1992). Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *Embo J* 11, 2241-6.
- Kutoh, E., Stromstedt, P. E., and Poellinger, L. (1992). Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF-1. *Mol Cell Biol* 12, 4960-9.
- Lanz, R. B., McKenna, N. J., Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.
- Lee, T. I., Wyrick, J. J., Koh, S. S., Jennings, E. G., Gadbois, E. L., and Young, R. A. (1998). Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 18, 4455-62.
- Lefstin, J. A., and Yamamoto, K. R. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392, 885-8.

- Lucibello, F. C., Slater, E. P., Jooss, K. U., Beato, M., and Muller, R. (1990). Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *Embo J* 9, 2827-34.
- Macalma, T., Otte, J., Hensler, M. E., Bockholt, S. M., Louis, H. A., Kalff-Suske, M., Grzeschik, K. H., von der Ahe, D., and Beckerle, M. C. (1996). Molecular characterization of human zyxin. *J Biol Chem* 271, 31470-8.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.
- McKay, L. I., and Cidlowski, J. A. (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12, 45-56.
- McKay, L. I., and Cidlowski, J. A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20, 435-59.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-44.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D., McKay, S., Kleiner, E. L., and Bird, A. P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507.
- Meyer, T., Carlstedt-Duke, J., and Starr, D. B. (1997). A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene. *J Biol Chem* 272, 30709-14.
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-91.
- Muchardt, C., and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Embo J* 12, 4279-90.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90, 1107-12.
- Neigeborn, L., and Carlson, M. (1984). Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108, 845-58.

- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-9.
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-7.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-83.
- Palaparti, A., Baratz, A., and Stifani, S. (1997). The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem* 272, 26604-10.
- Palvimo, J. J., Reinikainen, P., Ikonen, T., Kallio, P. J., Moilanen, A., and Janne, O. A. (1996). Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* 271, 24151-6.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A., and Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125, 3955-66.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R., and Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805-15.
- Pearce, D., and Yamamoto, K. R. (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* 259, 1161-5.
- Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Embo J* 6, 3333-40.
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N. E., and Groner, B. (1985). Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be dissociated from the proviral promoter and has enhancer properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1020-4.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Karvonen, U., Palvimo, J. J., and Janne, O. A. (1999). Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 274, 19441-6.
- Pratt, W. B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268, 21455-8.

- Prefontaine, G. G., Lemieux, M. E., Giffin, W., Schild-Poulter, C., Pope, L., LaCasse, E., Walker, P., and Hache, R. J. (1998). Recruitment of octamer transcription factors to DNA by glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 18, 3416-30.
- Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E. N., and Wolffe, A. P. (1996). An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* 274, 614-7.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-4.
- Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., König, H., Kramer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H. J., and et al. (1993). The activation and activity control of AP-1 (fos/jun). *Ann N Y Acad Sci* 684, 127-48.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-9.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18, 6455-61.
- Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J. D., Fitzpatrick, P. M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M. G., and Kushner, P. J. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* 15, 1554-63.
- Sakai, D. D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A., Rottman, F. M., and Yamamoto, K. R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2, 1144-54.
- Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S., Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-6.
- Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., and Baldwin, A. S., Jr. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15, 943-53.
- Schlingensiepen, R., Brysch, W., Schlingensiepen, K.-H. (ed.) (1997). *Antisense-From Technology to Therapy*. Blackwell Science Ltd., Berlin.

- Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P. A., Klocker, H., Launoit, Y., and Cato, A. C. (1996). Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 271, 23907-13.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-26.
- Shemshedini, L., Knauthe, R., Sassone-Corsi, P., Pornon, A., and Gronemeyer, H. (1991). Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *Embo J* 10, 3839-49.
- Sheppard, K. A., Phelps, K. M., Williams, A. J., Thanos, D., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Gerritsen, M. E., and Collins, T. (1998). Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 273, 29291-4.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-37.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., and Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354, 494-6.
- Smith, C. L., Onate, S. A., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1996). CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8884-8.
- Stern, M., Jensen, R., and Herskowitz, I. (1984). Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol* 178, 853-68.
- Stromstedt, P. E., Poellinger, L., Gustafsson, J. A., and Carlstedt-Duke, J. (1991). The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Mol Cell Biol* 11, 3379-83.
- Subramaniam, N., Cairns, W., and Okret, S. (1998). Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1. *J Biol Chem* 273, 23567-74.
- Subramaniam, N., Cairns, W., and Okret, S. (1997). Studies on the mechanism of glucocorticoid-mediated repression from a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *DNA Cell Biol* 16, 153-63.

- Szilak, L., Moitra, J., Krylov, D., and Vinson, C. (1997). Phosphorylation destabilizes alpha-helices. *Nat Struct Biol* 4, 112-4.
- Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M. G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* 10, 373-83.
- Touray, M., Ryan, F., Jaggi, R., and Martin, F. (1991). Characterisation of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* 6, 1227-34.
- Umesono, K., and Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-46.
- Valdez, B. C., Henning, D., Perlaky, L., Busch, R. K., and Busch, H. (1997). Cloning and characterization of Gu/RH-II binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 335-40.
- van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B. G., Koenderman, L., Raaijmakers, J. A., Johnson, J. P., and van der Saag, P. T. (1994). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 269, 6185-92.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 15, 3667-75.
- Wade, P. A., and Wolffe, A. P. (1997). Histone acetyltransferases in control. *Curr Biol* 7, R82-4.
- Walfish, P. G., Yoganathan, T., Yang, Y. F., Hong, H., Butt, T. R., and Stallcup, M. R. (1997). Yeast hormone response element assays detect and characterize GRIP1 coactivator-dependent activation of transcription by thyroid and retinoid nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3697-702.
- Wang, Y., Dooher, J. E., Koedood Zhao, M., and Gilmore, T. D. (1999). Characterization of mouse Trip6: a putative intracellular signaling protein. *Gene* 234, 403-9.
- Whyte, P., Williamson, N. M., and Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56, 67-75.
- Williams, J. M., Chen, G. C., Zhu, L., and Rest, R. F. (1998). Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol Microbiol* 27, 171-86.

- Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393, 392-6.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Young, R. A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-44.
- Wissink, S., van Heerde, E. C., Schmitz, M. L., Kalkhoven, E., van der Burg, B., Baeuerle, P. A., and van der Saag, P. T. (1997). Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 272, 22278-84.
- Wolffe, A. P., Khochbin, S., and Dimitrov, S. (1997). What do linker histones do in chromatin? *Bioessays* 19, 249-55.
- Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-7.
- Yamamoto, K. R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 19, 209-52.
- Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-15.
- Yi, J., and Beckerle, M. C. (1998). The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics* 49, 314-6.
- Zawel, L., and Reinberg, D. (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 44, 67-108.
- Zhao, M. K., Wang, Y., Murphy, K., Yi, J., Beckerle, M. C., and Gilmore, T. D. (1999). LIM domain-containing protein trip6 can act as a coactivator for the v-Rel transcription factor. *Gene Expr* 8, 207-17.
- Zilliaccus, J., Wright, A. P., Carlstedt-Duke, J., and Gustafsson, J. A. (1995). Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* 9, 389-400.
- Zong, W. X., Bash, J., and Gelinas, C. (1998). Rel blocks both anti-Fas- and TNF alpha-induced apoptosis and an intact Rel transactivation domain is essential for this effect. *Cell Death Differ* 5, 963-72.