



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6087

**Transkriptionelle Repression
als molekulare Grundlage
der anti-inflammatorischen
Wirkung von Glucocorticoiden**

S. Heck
Institut für Genetik

April 1998

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part is a list of the names of the members of the committee.

3. The third part is a list of the names of the members of the committee.

4. The fourth part is a list of the names of the members of the committee.

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6087

**Transkriptionelle Repression als molekulare Grundlage
der anti-inflammatorischen Wirkung von
Glucocorticoiden**

Stefanie Heck

Institut für Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1998

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Glucocorticoide finden aufgrund ihrer starken anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung eine breite therapeutische Anwendung, die jedoch längerfristig von unerwünschten Nebenwirkungen begleitet wird. Die Aufklärung der molekularen Wirkungsmechanismen dieser Hormone ist deshalb von großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse.

Die Wirkung von Glucocorticoiden wird in einer Zelle durch ihren Rezeptor (Glucocorticoidrezeptor, GR) vermittelt, der als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor im Zellkern die Expression von Genen induziert oder reprimiert. Mechanistisch gesehen könnten die erwünschten und unerwünschten Wirkungen einer Glucocorticoidtherapie aus diesen beiden genregulatorischen Eigenschaften des GR resultieren, weshalb es seit langem das Ziel vieler Untersuchungen ist, diese beiden Funktionen des GR zu trennen. Da viele immunregulatorische Gene durch Glucocorticoide reprimiert werden, ist anzunehmen, daß die Repression der Genexpression durch den GR für die entzündungshemmende Wirkung dieser Hormone verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Mutanten des GR gezeigt, daß zwar zwei verschiedene Mechanismen der Glucocorticoid-vermittelten Genrepression existieren, der GR jedoch Gene, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind, vermutlich durch einen einheitlichen Mechanismus reprimiert. Dieser Mechanismus konnte von der transkriptionellen Aktivierung von Genen durch den GR klar unterschieden werden. Diese Unterscheidung war auch durch die Verwendung synthetischer Liganden des GR möglich, die nur die Aktivierung, nicht jedoch die Repression von Genen vermittelten. Ein Vergleich der anti-inflammatorischen und genregulatorischen Eigenschaften dieser Steroid-Analoga zeigte, daß tatsächlich die transkriptionelle Repression von Genen durch den GR, nicht jedoch die Transaktivierung, mit der entzündungshemmenden Wirkung von Glucocorticoiden korreliert.

Da NF- κ B der wichtigste regulatorische Transkriptionsfaktor bei der Expression immunregulatorischer Gene ist, beruht die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden vermutlich größtenteils auf der Hemmung seiner Aktivität durch den GR. Bei der Untersuchung des molekularen Mechanismus dieser Hemmung konnte ausgeschlossen werden, daß die genaktivierende Eigenschaft des GR indirekt (über eine verstärkte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α) an der Repression der NF- κ B-Aktivität und dadurch an der Vermittlung anti-inflammatorischer Effekte beteiligt ist. Die negative Regulation von NF- κ B durch den GR kommt eher durch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen zustande.

Diese Arbeit unterstützt somit die Hypothese, daß die therapeutische Wirksamkeit von Glucocorticoiden als anti-inflammatorische Substanzen mit verringerten Nebenwirkungen durch Trennung der genregulatorischen Eigenschaften des GR verbessert werden kann.

Transcriptional repression as molecular basis of the anti-inflammatory action of glucocorticoids

Summary

The strong anti-inflammatory and immunosuppressive action of glucocorticoids has provided these hormones with a widespread therapeutic usage. Their long-term application is however accompanied by undesired side effects. Elucidation of the molecular mode of action of glucocorticoids is therefore of great scientific and medical interest.

The cellular action of glucocorticoids is mediated by a liganded receptor protein, the glucocorticoid receptor (GR), which induces or represses the expression of genes in the nucleus. Mechanistically the desirable and undesirable effects of glucocorticoid therapy may arise from this ability of the GR to differentially regulate the expression of genes and this has been the subject of several investigations over the years. Since several immune-regulatory genes are repressed by glucocorticoids, it can be assumed that the repression of gene expression by the GR is responsible for the anti-inflammatory effects of these hormones.

In the present study it has been shown with the help of GR mutants that in general two different mechanisms of glucocorticoid-mediated downregulation of gene expression exist. However, genes that are involved in immune and inflammatory reactions are repressed by the GR most likely through a uniform mechanism. This mechanism can clearly be distinguished from the transcriptional activation of genes by the GR. This distinction was also possible by the use of synthetic ligands of the GR that only activated but did not repress genes. A comparison of the anti-inflammatory action and regulatory properties of these steroid analogs on gene expression indicated that transcriptional repression but not activation by the GR correlated with the anti-inflammatory effects of glucocorticoids.

As NF- κ B is the most important transcription factor in the expression of immune-regulatory genes, the anti-inflammatory action of glucocorticoids is presumably based to a large extent on inhibition of NF- κ B-activity by the GR. In the molecular analysis of this regulatory action, a transactivating function of the GR involved in the synthesis of the inhibitor protein I κ B α was excluded as an indirect cause of GR-mediated downregulation of NF- κ B-activity and of the anti-inflammatory process. Instead the negative regulation of NF- κ B by the GR is brought about by a protein-protein-interaction of NF- κ B and the GR.

This work therefore supports the hypothesis that the therapeutic efficacy of glucocorticoids as anti-inflammatory substances with reduced side effects can be improved by dissociation of the regulatory activities of the GR at the level of gene expression.

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Biologische Wirkungen von Glucocorticoiden.....	1
1.2 Struktur des Glucocorticoidrezeptors (GR)	2
1.3 Mechanismus der Steroidhormonwirkung am Beispiel des GR: Regulation der Genexpression	4
1.3.1 Positive Genregulation: Transaktivierung durch den GR	5
1.3.2 Negative Genregulation: Transrepression durch den GR	6
1.3.2.1 Konkurrenz um eine überlappende Bindestelle: Das Rinder Prolaktin-Modell	8
1.3.2.2 Ausbildung eines inaktiven Komplexes: Interaktion zwischen GR und AP-1 am Beispiel des menschlichen Kollagenase I-Gens	9
1.3.2.3 Ausbildung eines inaktiven Komplexes: Interaktion zwischen GR und NF- κ B	10
1.4 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden	15
Material	
2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Oligonukleotide	17
2.3 Plasmidkonstrukte.....	18
2.4 Sonden für RNA-Hybridisierungen.....	20
2.5 Antikörper	21
2.6 Bakterien und eukaryontische Zellen.....	21
Methoden	
2.7 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nucleinsäuren	24
Extraktion von Nucleinsäuren.....	24
Ausfällung von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen.....	24
Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	24
2.8 DNA-Klonierungstechniken.....	24
Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	24
Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	25
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	25
Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	25
Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	26
Präparation von kompetenten Bakterien für die Transformation (nach Hanahan,1986)	26
Transformation von Bakterien (nach Hanahan, 1986)	26

2.9	Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	26
	Plasmid-DNA-Präparation in kleinem Maßstab ("Minipräp")	26
	Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab ("Maxipräp")	27
2.10	Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte	27
	Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977)	27
	Auftrennung der Sequenzierreaktionen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.11	Radioaktive Markierung und Reinigung von Sonden für RNA-Hybridisierungen ...	28
	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	28
	Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten durch Gelfiltration	29
2.12	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen	29
	Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)	29
	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970)	29
	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	30
2.13	Zellkultur	30
	Passagieren von Zellen	30
	Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
	Herstellung von CCS (<i>charcoal calf serum</i>) für transiente Transfektionen (nach Westley und Rochefort, 1980)	31
2.14	Transiente Transfektionen	31
	Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode (nach Graham und van der Eb, 1973)	31
	DEAE-Dextran-Methode (nach Kawai und Nishizawa, 1984)	32
2.15	Analyse der Genexpression durch den Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivitätstest (Gorman et al., 1982)	32
	Präparation von Proteinextrakten für CAT-Analysen	32
	CAT-Aktivitätstest	33
2.16	Analyse der Genexpression durch den Luciferase-Aktivitätstest (nach de Wet et al., 1987)	33
	Präparation von Proteinextrakten für Luciferase-Analysen	33
	Luciferase-Aktivitätstest	33
2.17	Analyse von RNA durch Transfer auf Membranen und Detektion durch radioaktiv markierte DNA-Fragmente (<i>Northern-Blot</i>)	34
	Präparation von poly A ⁺ RNA aus Zellen	34
	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	34
	<i>Northern-Blot</i> und Hybridisierung	35
2.18	Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (<i>Western-Blot</i>)	36
	Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den <i>Western-Blot</i>	36
	<i>Western-Blot</i> und Detektion von Proteinen auf Membranen	36

2.19	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen ...	37
	<i>In vitro</i> Transkription/Translation.....	37
	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)	
	Fusionsproteinen.....	37
	GST-Fusionsprotein-Interaktionstest.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Trennung von Transaktivierung und Transrepression mit Hilfe von	
	Mutanten des GR und Vergleich seiner transreprimierenden Aktivität an	
	verschiedenen Zielgenen.....	39
3.1.1	Zur Unterscheidung von Transaktivierung und Transrepression	
	verwendete Mutanten.....	39
3.1.2	Transaktivierende Eigenschaften der Gruppe I- und Gruppe II-Mutanten ...	42
3.1.3	Mutationen in der Dimerisierungsdomäne beeinträchtigen nicht die	
	Fähigkeit des GR, die Aktivität des Transkriptionsfaktors	
	AP-1 zu reprimieren.....	44
3.1.4	Dissoziierende Mutanten des GR unterscheiden zwischen verschiedenen	
	Mechanismen der Transrepression.....	48
3.2	Trennung der positiven und negativen Genregulation durch den GR	
	mit Hilfe von Liganden und Zuordnung einer dieser Eigenschaften zu deren	
	anti-inflammatorischer Wirkung.....	52
3.2.1	Glucocorticoid-Antagonisten eignen sich nur begrenzt zur Dissoziation	
	von Transaktivierung und Transrepression.....	53
3.2.2	Bestimmte Glucocorticoid-Analoga können zwischen Transaktivierung	
	und Transrepression unterscheiden.....	55
3.3	Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den GR.....	61
3.3.1	Synthese des Inhibitorproteins I κ B α durch den GR.....	62
3.3.1.1	Die Transkription des I κ B α -Gens wird durch	
	Dexamethason induziert.....	62
3.3.1.2	Eine Mutante des GR reprimiert die NF- κ B-Aktivität,	
	obwohl sie I κ B α nicht mehr synthetisieren kann.....	64
3.3.1.3	Dissoziierende Steroid-Analoga können die NF- κ B-Aktivität	
	nicht mehr reprimieren, obwohl sie die I κ B α -Synthese	
	noch vermitteln.....	69
3.3.1.4	Andere Steroidhormonrezeptoren hemmen die Aktivität von	
	NF- κ B, ohne I κ B α zu induzieren.....	72
3.3.2	Protein-Protein-Interaktion zwischen NF- κ B und dem GR.....	76
3.3.2.1	Bereiche in der DNA-Bindedomäne und im Carboxy-Terminus	
	des GR sind an der Hemmung der NF- κ B-Aktivität beteiligt.....	76
3.3.2.2	Die beiden NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 interagieren	
	mit einem Bereich im Carboxy-Terminus des GR.....	79

4 Diskussion	85
4.1 Trennung von positiver und negativer Genregulation.....	85
4.1.1 Unterscheidung durch Mutanten des GR.....	85
4.1.2 Unterscheidung durch Liganden des GR.....	87
4.2 Unterscheidung verschiedener Mechanismen der negativen Genregulation.....	88
4.3 Transkriptionelle Interferenz zwischen dem GR und NF- κ B.....	90
4.3.1 Glucocorticoid-induzierte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α	90
4.3.2 Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B.....	92
4.4 Physiologische Bedeutung der negativen Genregulation.....	94
5 Abkürzungen	97
6 Literatur	99

1 Einleitung

Das Hormonsystem des menschlichen Körpers stellt eine wichtige informationsübertragende Instanz dar, die eine Vielzahl lebensnotwendiger physiologischer Prozesse steuert. Hormone wirken dabei als Botenstoffe, die ein Signal von den endokrinen Zellen ihres Bildungsorts über den Blutstrom an eine Zielzelle in ihrem Erfolgsorgan weiterleiten.

Steroidhormone bilden innerhalb dieses Systems eine Gruppe von Substanzen, die aufgrund ihrer Struktur und Wirkungsweise zusammengefaßt werden. Ihre Biosynthese geht von Cholesterol aus, weshalb allen diesen Hormonen als Grundstruktur ein Cyclopentanphenantren-Gerüst gemeinsam ist. Zur Gruppe der Steroidhormone gehören die adrenalen Mineralocorticoide (Aldosteron) und Glucocorticoide (Cortisol, Corticosteron), die weiblichen (Estrogen, Progesteron) und männlichen (Testosteron) Gonadenhormone, sowie das Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃) aber auch das Häutungshormon der Arthropoden (Ecdyson).

Aufgrund ihres lipophilen Charakters können Steroidhormone durch passive Diffusion die Membran ihrer Zielzelle durchdringen. Dort entfalten sie ihre Wirkung durch Bindung an ein spezifisches Rezeptorprotein. Dieser Steroidrezeptor vermittelt die Hormonwirkung größtenteils auf Ebene der Genexpression. Er kontrolliert differenziert die Expression spezifischer Gene (zur Übersicht siehe Beato, 1989; Cato et al., 1992a; Mangelsdorf et al., 1995). So können verschiedene Steroidhormone trotz ihrer Ähnlichkeit in Struktur und Wirkungsweise ganz unterschiedliche Wirkungen bei der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus, sowie bei der Regulation physiologischer Prozesse entfalten.

Die Beteiligung von Steroidhormonen an diversen biologischen Prozessen macht es natürlich auch attraktiv, ihre Eigenschaften für klinische Zwecke zu nutzen. Vor allem die weiblichen Gonadenhormone als Kontrazeptiva und die adrenalen Glucocorticoide als entzündungshemmende Substanzen haben diesbezüglich eine große Bedeutung erlangt. Die unterschiedlichen Wirkungen von Glucocorticoiden, gerade bei ihrer therapeutischen Anwendung, haben auch das Interesse dieser Arbeit begründet. Im Folgenden wird daher die Wirkung von Steroidhormonen am Beispiel der Glucocorticoide genauer dargestellt.

1.1 Biologische Wirkungen von Glucocorticoiden

Glucocorticoide spielen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung der Lunge und der Nebenniere (Cole et al., 1995). Im adulten Organismus regulieren sie den Kohlenhydratstoffwechsel, vermitteln Stress-Reaktionen und haben einen Einfluß auf das Nerven- und Immunsystem. Sie hemmen die Proliferation von Lymphocyten und sind in der Lage, Entzündungsreaktionen entgegenzuwirken (zur Übersicht siehe Baxter und Forsham,

1972; Munck und Toth, 1995). Bei stressinduzierten Reaktionen kommt es, ausgelöst durch die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, zu einer Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebenniere, welche die Immunfunktionen des Körpers stark beeinflussen (Blalock, 1994). Man vermutet, daß diese physiologische Regulation der Immunfunktionen durch Glucocorticoide die körpereigenen Abwehrmechanismen vor einer Überreaktion während einer Infektion oder Verletzung schützt (Munck et al., 1984). Diese physiologische Eigenschaft von Glucocorticoiden hat dazu geführt, daß diese Hormone sehr erfolgreich als anti-inflammatorische und immunsuppressive Medikamente Anwendung finden.

Die Anwendung von Glucocorticoiden als therapeutische Wirkstoffe geht zurück bis in die Mitte dieses Jahrhunderts. Zu dieser Zeit etablierte sich die Nützlichkeit von Cortison bei der Reduktion der Symptome von rheumatischer Arthritis (Hench et al., 1949). Von da an fanden Glucocorticoide und ihre synthetischen Analoga eine breite Anwendung bei der Behandlung vieler inflammatorischer Erkrankungen. Heute haben diese Substanzen als Medikamente einen festen Platz in der Therapie von rheumatischer Arthritis, Allergien, Asthma und Erkrankungen des Kollagen-Gewebes (Cutroneo et al., 1986; Boumpas, 1993).

Nach Langzeitanwendung von Glucocorticoiden treten jedoch verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen auf. Dazu gehören beispielsweise Hautatrophien, Diabetes, Hypertonie, Störungen des Immunsystems mit erhöhter Infektanfälligkeit und Verlust von Mineralien aus Knochen, was zu Osteoporose führt (Cutroneo et al., 1986; Boumpas, 1993). Deshalb wurde schon seit längerem der Versuch unternommen, durch die Entwicklung modifizierter synthetischer Glucocorticoid-Analoga eine Trennung der nützlichen und unerwünschten Eigenschaften dieser Hormone zu erreichen (Töpert, 1988). Trotz intensiver Forschung war dieser Versuch jedoch bislang nur begrenzt erfolgreich.

Um so erstaunlicher ist es, daß die molekularen Grundlagen der nützlichen therapeutischen Wirkungen von Glucocorticoiden, sowie die ihrer unerwünschten Nebenwirkungen, bisher noch weitgehend unbekannt sind. Möglicherweise reflektieren diese verschiedenartigen biologischen Eigenschaften von Glucocorticoiden ihre unterschiedlichen Wirkungen bei der Regulation der Expression spezifischer Gene. Will man zwischen diesen biologischen Eigenschaften differenzieren, so ist es deshalb notwendig, die molekulare Wirkungsweise dieser Steroidhormone genauer zu kennen.

1.2 Struktur des Glucocorticoidrezeptors (GR)

Wie andere Steroidhormone interagieren Glucocorticoide in ihren Zielzellen mit ihrem Rezeptorprotein, dem Glucocorticoidrezeptor (GR). Der GR gehört zu einer Klasse ligandenbindender Transkriptionsfaktoren, die neben den Rezeptoren für Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Progesteron, Androgene und Estrogene auch Rezeptoren wie den Vitamin D3-Rezeptor, den Thyroidhormon-Rezeptor und den Rezeptor für Retinsäure enthält (Evans,

1988; Green und Chambon, 1988; Beato, 1989). Diese Steroid/Thyroid-Rezeptor Familie ist wiederum Teil der großen Superfamilie nuklearer Rezeptoren, für deren weitere Mitglieder natürliche Liganden bislang nicht bekannt sind (sogenannte *Orphan*-Rezeptoren; Mangelsdorf et al., 1995).

Die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft innerhalb dieser Superfamilie beruht auf der Domänenstruktur der Rezeptoren. Wie die anderen Mitglieder dieser Familie ist daher auch der GR aus drei Haupt-Domänen aufgebaut (Abb. 1): einer amino (N)-terminalen Domäne, einer zentralen DNA-Bindedomäne (DBD), die über eine Gelenk (*hinge*)-Region mit einer carboxy (C)-terminalen Hormon-Bindedomäne (HBD) verbunden ist (zur Übersicht siehe Evans, 1988; Beato, 1989; Cato et al., 1992a; Tsai und O'Malley, 1994; Beato et al., 1995).

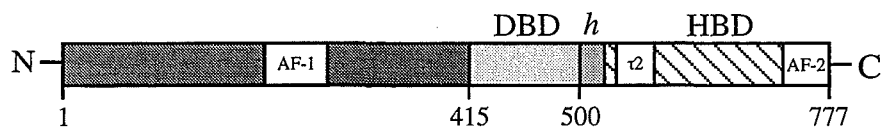


Abb. 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel des menschlichen Glucocorticoidrezeptors. Eine Zuordnung der Rezeptorfunktionen zu den einzelnen Domänen ist im Text beschrieben. Die Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen. N, Amino-Terminus; C, Carboxy-Terminus; AF-1, Aktivierungsfunktion 1; $\tau 2$, Transaktivierungsdomäne $\tau 2$; AF-2, Aktivierungsfunktion 2; DBD, DNA-Bindedomäne; *h*, *hinge*-Region; HBD, Hormon-Bindedomäne.

Die N-terminale Domäne enthält einen Bereich, der wichtig für die Aktivierung der Transkription durch den Rezeptor ist, die Transaktivierungsdomäne $\tau 1$ (Hollenberg et al., 1987; Godowski et al., 1988; Hollenberg und Evans, 1988; Cato et al., 1992a). Im GR befindet sich die aktive Kernregion dieser Domäne zwischen den Aminosäurepositionen 187 und 244 und wird als Aktivierungsfunktion AF-1 bezeichnet (Dahlman-Wright et al., 1994).

Die zentral gelegene DNA-Bindedomäne (DBD) ist innerhalb der Steroidrezeptor-Familie hoch konserviert. Sie ist durch zwei Zinkfinger-Motive charakterisiert, wobei jeweils ein Zink-Ion durch vier Cysteine koordiniert ist (siehe auch Abb. 4, Kapitel 3; Freedman et al., 1988). Aminosäuren im N-terminalen Zinkfinger der DBD sind für die sequenzspezifische Bindung an die DNA verantwortlich (Umesono und Evans, 1989; Härd et al., 1990; zur Übersicht siehe Zilliaccus et al., 1995). Im C-terminalen Zinkfinger befinden sich Aminosäuren, die für die Dimerisierung von GR-Molekülen notwendig sind (Dimerisierungsdomäne, siehe Abb. 4, Kapitel 3; Dahlman-Wright et al., 1991; zur Übersicht siehe Glass, 1994).

Die DBD ist mit der Hormon-Bindedomäne (HBD) durch eine *hinge*-Region verbunden. In diesem Bereich befinden sich Sequenzen, die an der Translokation des Rezeptors in den Kern beteiligt sind (*nuclear localization signal*, NLS; Picard und Yamamoto, 1987).

Die C-terminale Hormon-Bindedomäne (HBD) ist neben der Bindung des Steroidhormons (Carlstedt-Duke et al., 1988) auch an der Transaktivierung beteiligt. Es wurde eine Transaktivierungsdomäne $\tau 2$ gleich anschließend an die DBD beschrieben (Hollenberg und

Evans, 1988), sowie eine weitere Transaktivierungsfunktion AF-2 am C-terminalen Ende des Rezeptors (Aminosäuren 727-763), deren Aktivität im Gegensatz zur AF-1 im N-Terminus ligandenabhängig ist (Danielian et al., 1992). Ferner enthält diese Region ein Signal für die Interaktion mit Hitzeschockproteinen (Pratt et al., 1988; Howard und Distelhorst, 1988), sowie ein zweites Signal für die Translokation des GR in den Kern (Picard und Yamamoto, 1987).

1.3 Mechanismus der Steroidhormonwirkung am Beispiel des GR: Regulation der Genexpression

Hitzeschockproteine wie Hsp90, Hsp70 und Hsp56 halten den GR in Abwesenheit seines Liganden inaktiv im Cytoplasma in einem Komplex mit weiteren Chaperon-Proteinen (Dittmar et al., 1997; zur Übersicht siehe Pratt, 1993). Dieser Multi-Proteinkomplex hält den Rezeptor in einer für die Ligandenbindung geeigneten Konformation. Durch Bindung des Hormons kommt es zu einer Dissoziation dieser assoziierten Proteine, wodurch der Rezeptor in einen transkriptionell aktiven Zustand übergeht und in den Zellkern wandert (Denis et al., 1988; Howard und Distelhorst, 1988) (Abb. 2). In diesem aktiven Zustand ist der Rezeptor in der Lage, Homodimere auszubilden (Wrange et al., 1989), wobei nicht geklärt ist, ob diese Dimerisierung nicht erst bei der Bindung des Rezeptors an die DNA stattfindet (Eriksson und Wrange, 1990).

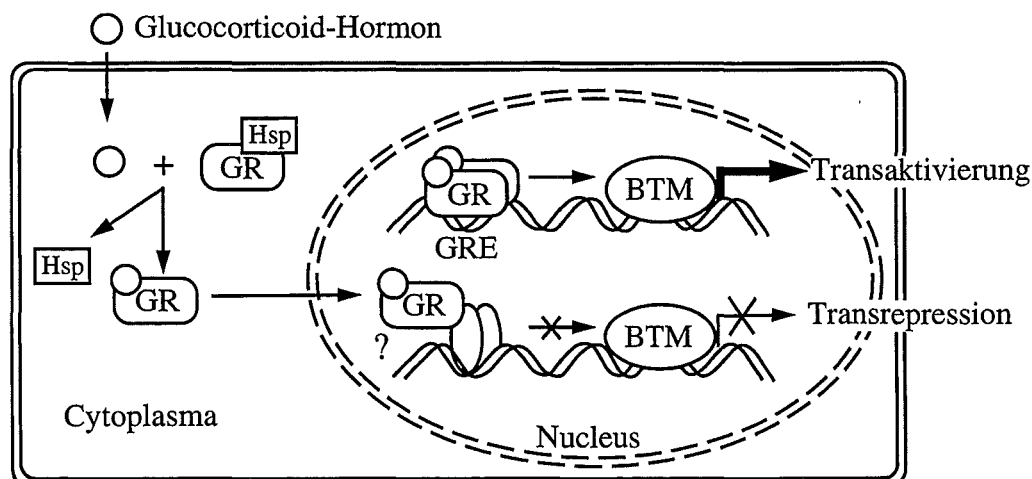


Abb. 2: Vereinfachtes Modell der Steroidhormonwirkung am Beispiel von Glucocorticoiden. (Erklärungen siehe Text.) GR, Glucocorticoidrezeptor; Hsp, Hitzeschockproteine; GRE, auf Glucocorticoide reagierendes Element (*glucocorticoid response element*); BTM, basale Transkriptionsmaschinerie.

Im Zellkern entfaltet der ligandenaktivierte GR seine Wirkung, indem er die Expression spezifischer Gene reguliert. Dies kann durch Aktivierung der Transkription (Transaktivierung),

aber auch durch Repression der Transkription (Transrepression) verschiedener Gene erfolgen (Abb. 2).

1.3.1 Positive Genregulation: Transaktivierung durch den GR

Der GR induziert die Transkription von hormonregulierten Genen, indem er als Homodimer durch sein Zinkfinger-Motiv an spezifische Erkennungssequenzen in der Promotorregion dieser Gene bindet. Dabei handelt es sich um eine palindromische DNA-Sequenz (Konsensus: AGAACANNNTGTTCT), die man als Glucocorticoid-reagierendes-Element (*glucocorticoid response element*, GRE) bezeichnet (Abb. 2; zur Übersicht siehe Glass, 1994; Zilliacus et al., 1995). Für die Transaktivierung hormonregulierter Gene ist eine Bindung des GR an die DNA als Homodimer absolut notwendig. Beispiele für diese positive Genregulation durch den GR sind das Gen für die an der Gluconeogenese beteiligte Tyrosin-Aminotransferase (Jantzen et al., 1987), der *Long Terminal Repeat* (LTR)-Promotor des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) (Ponta et al., 1985) und das menschliche Metallothionein IIA-Gen (Karin et al., 1984).

Eine korrekte Initiation der Transkription erfordert einen Multiprotein-Komplex aus verschiedenen basalen Faktoren, der sich zusammen mit der RNA-Polymerase II an der Startstelle der Transkription (TATA-Box) anlagert (Transkriptions-Initiations-Komplex). Um die Transkription zu aktivieren, muß der GR nach Bindung an die DNA mit dieser basalen Transkriptionsmaschinerie kommunizieren, um direkt oder indirekt die Ausbildung dieses Komplexes zu ermöglichen und/oder ihn zu stabilisieren (Abb. 2).

Es wurde gezeigt, daß Steroidrezeptoren *in vitro* direkt mit Komponenten des Transkriptions-Initiations-Komplexes interagieren können, wie beispielsweise dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und dem basalen Transkriptionsfaktor TFIIB. Die physiologische Signifikanz dieser Interaktionen bleibt jedoch unklar (zur Übersicht siehe Tsai und O'Malley, 1994; Horwitz et al., 1996; McEwan et al., 1996).

In jüngster Zeit häuften sich jedoch die Hinweise, daß auch intermediäre koregulatorische Faktoren existieren, die als Brückenproteine zwischen dem Rezeptor und dem Transkriptions-Initiations-Komplex fungieren könnten (Koaktivatoren). Mittlerweile ist eine Vielzahl solcher potentieller Faktoren beschrieben, die spezifisch mit Mitgliedern der Superfamilie nuklearer Rezeptoren interagieren (zur Übersicht siehe Horwitz et al., 1996; McEwan et al., 1996). Die Bedeutung dieser Interaktionen ist jedoch in den meisten Fällen nicht geklärt und es bleibt zu untersuchen, ob diese Faktoren tatsächlich eine Funktion als Koaktivatoren erfüllen. Die ligandenabhängige Interaktion zwischen dem GR und dem Protein RAP46 (Zeiner und Gehring, 1995) ist ein Beispiel für eine Wechselwirkung, deren Funktion noch offen ist. Dagegen sind beispielsweise die Proteine SRC-1 (Ofiate et al., 1995), TIF-2/GRIP-1 (Voegel et al., 1996; Hong et al., 1996) und CBP/p300 (Kamei et al., 1996; Chakravarti et al., 1996) mittlerweile relativ gut als Koaktivatoren für den GR und für andere nukleare Rezeptoren

charakterisiert. Sie interagieren durch ein bestimmtes Sequenz-Motiv (Heery et al., 1997) mit der Transaktivierungsfunktion AF-2 im C-Terminus der Steroidrezeptoren und verstärken deren ligandeninduzierte transkriptionelle Aktivität. Aufgrund ihrer Homologie faßt man SRC-1, TIF-2/GRIP-1 und ähnliche Proteine zu einer Familie der Koaktivatoren spezifisch für nukleare Rezeptoren zusammen (NCoA-Familie; Torchia et al., 1997). Im Gegensatz dazu fungieren CBP/p300 auch als Koaktivatoren für andere Transkriptionsfaktoren, darunter CREB (Kwok et al., 1994), AP-1 (Arias et al., 1994) und NF- κ B (Gerritsen et al., 1997). Mitglieder der NCoA-Familie und CBP/p300 interagieren auch untereinander (Kamei et al., 1996; Torchia et al., 1997), was in einer synergistischen Aktivierung der Steroidrezeptor-vermittelten Transkription resultiert (Smith et al., 1996).

Ein Hinweis auf den Mechanismus, wie diese Steroidrezeptor-assoziierten Koaktivatoren die Ausbildung eines stabilen Transkriptions-Initiations-Komplexes bewirken könnten, ergab die Beobachtung, daß beispielsweise CBP und SRC-1 eine eigene Histon-Acetyltransferase-Aktivität besitzen und auch mit anderen Histon-Acetyltransferasen interagieren können (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Spencer et al., 1997). Histon-Acetylierung resultiert in einer Veränderung der Chromatinstruktur, was ein essentieller Schritt bei der Regulation der Transkription darstellt (Wade und Wolffe, 1997). Durch Acetylierung DNA-gebundener Histone wird der inhibitorische Effekt des Chromatins auf die Genexpression aufgehoben, so daß auch Faktoren des Transkriptions-Initiations-Komplexes besseren Zugang zum Chromatin haben und die Transaktivierung spezifischer Gene stattfinden kann.

1.3.2 Negative Genregulation: Transrepression durch den GR

Die hormoninduzierte Repression der Transkription durch den GR (Transrepression; Abb. 2) ist mechanistisch schwerer zu definieren, als seine transaktivierende Funktion. Ob die Transrepression die gleichen Eigenschaften des Rezeptors erfordert, wie die Transaktivierung (z.B. Dimerisierung und DNA-Bindung), ist nicht eindeutig geklärt, zumal es bisher noch nicht möglich war, ein allgemein gültiges Modell für die Glucocorticoid-vermittelte Repression von Genen zu formulieren. Dies liegt vor allem darin begründet, daß der GR transkriptionell die Expression ganz unterschiedlicher Gene mit jeweils völlig verschiedenem Promotorkontext reprimiert (zur Übersicht siehe Miner et al., 1991; Cato et al., 1992b; Saatcioglu et al., 1994). Zu diesen Genen gehören beispielsweise das Rinder Prolaktin-Gen (Sakai et al., 1988), das Ratten Proopiomelanocortin-Gen (Drouin et al., 1989), das Maus Proliferin-Gen (Mordacq und Linzer, 1989; Diamond et al., 1990), das α -Fetoprotein-Gen der Ratte (Zhang et al., 1991a), das menschliche Osteocalcin-Gen (Strömstedt et al., 1991) und das Gen für das menschliche Corticotropin *Releasing* Hormon (Malkoski et al., 1997).

Auffallend ist, daß Glucocorticoide auch die Expression einer Vielzahl von Genen reprimieren, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind und für Cytokine, Zell-Adhäsionsmoleküle und Enzyme kodieren. Eine Auswahl dieser Gene ist in Tabelle 1

dargestellt. Die Produkte dieser Gene spielen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Auto-Immunerkrankungen und bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen. Dies läßt vermuten, daß die transkriptionelle Repression dieser Gene durch Glucocorticoide für die anti-arthritischen, anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekte der Hormone verantwortlich sind (zur Übersicht siehe Barnes und Adcock, 1993; Cato und Wade, 1996). So nimmt man beispielsweise an, daß Glucocorticoide durch Hemmung der Cytokin-Gen-expression und der Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen wie dem Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) die Rekrutierung und Wanderung von Leukocyten an den Ort einer Entzündung oder Infektion verhindern (Cronstein et al., 1992).

Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Expression dieser Gene haben gezeigt, daß einige davon durch den Transkriptionsfaktor AP-1 und der Großteil durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B positiv reguliert werden (Tabelle 1). Dies macht es wahrscheinlich, daß die Hemmung der Aktivität von AP-1 und vor allem von NF- κ B durch den GR die Grundlage der immunsuppressiven und entzündungshemmenden Wirkung von Glucocorticoiden bildet.

Tabelle 1: Auswahl an Genen, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind und durch Glucocorticoide reprimiert werden. Zu jedem Gen wurde der jeweilige Transkriptionsfaktor aufgelistet, der die Expression dieses Gens positiv reguliert und dessen Aktivität durch den GR reprimiert wird. ICAM-1, Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1; ELAM-1, Endotheliales Leukocyten Adhäsionsmolekül-1; MHC, *major histocompatibility complex*; IL, Interleukin; iNOS, induzierbare NO-Synthetase. (verändert nach Cato und Wade, 1996).

Gene	Regulatorisches Element	Referenz
Oberflächen-Moleküle		
ICAM-1	NF- κ B	van de Stolpe et al. 1995; Caldenhoven et al., 1995
E-Selectin (früher ELAM-1)	NF- κ B	Montgomery et al., 1991; Cronstein et al., 1992
MHC Klasse I	nicht bekannt	von Knebel-Doeberitz et al., 1990
MHC Klasse II	nicht bekannt	Schwiebert et al., 1995
Cytokine		
IL-1 β	c/EBP β , CREB	Lee et al., 1988; Tsukada et al., 1994
IL-2	NF-AT, AP-1	Vacca et al., 1992; Paliogianni et al., 1993
IL-6	NF- κ B, c/EBP β	Ray et al., 1990; Stein und Yang, 1995
IL-8	NF- κ B	Mukaida et al., 1994
Interferon γ	AP-1, CREB-ATF	Cippitelli et al., 1995
Enzyme		
iNOS	NF- κ B	Radomski et al., 1990; Xie et al., 1994
Kollagenase I	AP-1	Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990

Prinzipiell findet eine transkriptionelle Repression der Genexpression dann statt, wenn ein Transkriptionsfaktor durch einen anderen Faktor von seiner erfolgreichen Wechselwirkung mit dem Transkriptions-Initiations-Komplex abgehalten wird (Abb. 2). Diese transkriptionelle Interferenz kann theoretisch durch Konkurrenz um eine gemeinsame oder überlappende DNA-Bindestelle, durch Konkurrenz um einen gemeinsamen Mediator zum Transkriptions-Initiations-Komplex oder durch die Ausbildung eines inaktiven Komplexes erfolgen.

Die durch den GR stattfindende Repression der Genexpression kann allgemein in zwei Gruppen eingeteilt werden: (i) Der GR kann mit einem aktiven Transkriptionsfaktor um eine überlappende Bindestelle in der Promotorregion eines Gens konkurrieren. Ein Beispiel für diese Art der negativen Genregulation durch den GR ist das menschliche Osteocalcin-Gen oder das Rinder Prolaktin-Gen. (ii) Der GR kann durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion die Aktivität eines Transkriptionsfaktors durch Ausbildung eines inaktiven Komplexes hemmen. Dies ist veranschaulicht an Genen, die positiv durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B reguliert werden. Im Anschluß sollen diese Modelle an Beispielen näher erläutert werden.

1.3.2.1 Konkurrenz um eine überlappende Bindestelle: Das Rinder Prolaktin-Modell

Negative Genregulation durch den GR durch Konkurrenz um DNA-Bindung wurde beispielsweise am Promotor des Rinder Prolaktin-Gens beobachtet (Sakai et al., 1988). Das Prolaktin-Gen wird in der Hypophyse exprimiert und ist am negativen Rückkopplungs-Mechanismus zwischen adrenalen Glucocorticoiden und Adrenocorticotropinen der Hypophyse beteiligt. In der Promotorregion dieses Gens befinden sich sogenannte negativ auf Glucocorticoide reagierende Elemente (negative GREs; nGRE), die eine Repression der Transkription durch Glucocorticoide vermitteln. Diese Elemente unterscheiden sich von einem klassischen GRE insofern, als nach Bindung des GR an dieses nGRE keine positive sondern negative Regulation der Genexpression stattfindet. Ein Sequenzvergleich zeigte keine Ähnlichkeit mit einer klassischen Konsensus-GRE-Sequenz. In Abwesenheit von Hormon binden an das nGRE im Promotor des Prolaktin-Gens zwei Faktoren, die für die konstitutive basale Expression des Gens verantwortlich sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich um den Hypophysen-spezifischen Transkriptionsfaktor Pit-1/GHF-1 und einen ubiquitär exprimierten, aber noch nicht weiter identifizierten Faktor XTF (Subramaniam et al., 1997). In Anwesenheit von aktiviertem GR wird die Expression des Gens gehemmt, vermutlich durch Verdrängung dieser Faktoren vom nGRE. Eine Bindung des GR an das nGRE im Prolaktin-Promotor wurde bisher *in vitro* mit gereinigtem Rezeptorprotein gezeigt (Sakai et al., 1988). Hinweise, daß die DNA-Bindung des GR für die Repression der Transkription durch ein nGRE notwendig sein könnte (Sakai et al., 1988; Schena et al., 1989), lassen vermuten, daß dieses Prinzip der negativen Genregulation tatsächlich auf einer Konkurrenz um überlappende Bindestellen basiert.

1.3.2.2 Ausbildung eines inaktiven Komplexes: Interaktion zwischen GR und AP-1 am Beispiel des menschlichen Kollagenase I-Gens

Anders als bei der negativen Regulation des Rinder Prolaktin-Gens scheint an der transkriptionellen Interferenz zwischen dem GR und dem Transkriptionsfaktor AP-1 eher eine physikalische Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen als eine DNA-Bindung des GR beteiligt zu sein. Eines der am besten untersuchten Beispiele für diese Interferenz ist die Repression der Expression des menschlichen Kollagenase I-Gens durch Glucocorticoide (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990).

Kollagenase I ist eine Metalloprotease, die an der Gewebeerstörung beispielsweise bei rheumatischer Arthritis beteiligt ist. Die Hemmung dieses Gens durch Glucocorticoide trägt vermutlich zur anti-arthritischen Wirkung dieser Hormone bei. Das Kollagenase I-Gen wird positiv durch den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert. AP-1 setzt sich als Homo- oder Heterodimer aus einer Gruppe verwandter Transkriptionsfaktoren zusammen, von denen das c-Jun und das c-Fos Protein (Produkte der c-jun und c-fos Protoonkogene) als Heterodimer die Hauptkomponenten des zellulären AP-1 darstellen (zur Übersicht siehe Angel und Karin, 1991). Die Aktivierung von AP-1 erfolgt durch verschiedene physiologische (z.B. Wachstumsfaktoren, Protoonkogene) und unphysiologische Agenzien (z.B. UV-Strahlung, Tumorpromotoren wie der Phorbol-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 Bindung an eine spezifische Bindestelle in dessen Promotorregion, das sogenannte auf TPA reagierende Element (TRE) (Angel et al., 1987a, 1987b; Lee et al., 1987). Das Kollagenase I-Gen enthält jedoch keine Bindestelle für den GR. Der GR hemmt die positive Wirkung von AP-1, ohne daß er an den Promotor des Kollagenase I Gens bindet und ohne daß AP-1 von seiner Bindestelle am Promotor verdrängt wird (Jonat et al., 1990; König et al., 1992). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die Eigenschaften des GR, die für eine Transaktivierung von Genen benötigt werden, für seine transreprimierende Funktion nicht erforderlich sind. Dennoch scheint, neben anderen Bereichen des GR, die DNA-Bindedomäne des Rezeptors für die Repression notwendig zu sein (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Kerppola et al., 1993), was darauf hinweist, daß dieser Bereich zusätzlich zur DNA-Bindung noch andere Funktionen ausübt. Die transkriptionelle Interferenz zwischen dem GR und AP-1 ist wechselseitig, da AP-1 auch die hormonabhängige Aktivität des GR an Promotoren hemmen kann, die klassische GREs enthalten (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990). Auch dabei wird der GR nicht von seiner Bindestelle verdrängt (Reik et al., 1994). Eine physikalische Interaktion zwischen dem GR und AP-1-Untereinheiten wurde durch *in vitro* Interaktionsstudien gezeigt (Diamond et al., 1990; Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Touray et al., 1991). Alle diese Daten sprechen dafür, daß der GR die Aktivität von AP-1 hemmt, indem er direkt oder über ein Partnerprotein mit AP-1 interagiert, ohne dabei selbst an die DNA zu binden oder die DNA-Bindung von AP-1 zu behindern. Das Resultat dieser Interaktion ist die Ausbildung eines transkriptionell inaktiven DNA-gebundenen

Komplexes. Wie der GR das Transaktivierungspotential von AP-1 stört, ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise blockiert er den Kontakt von AP-1 zum Transkriptions-Initiations-Komplex bzw. zu einem Brückenprotein oder einem Koaktivator von AP-1.

Interessanterweise wurde vor kurzem ein ergänzender Mechanismus für die transkriptionelle Interferenz zwischen GR und AP-1 beschrieben, der darauf basiert, daß sowohl der GR als auch AP-1 an dasselbe Koaktivatorprotein CBP (*CREB-binding protein*) binden (Kamei et al., 1996). Durch Konkurrenz um limitierende Mengen an CBP könnte es so zur Repression der AP-1-Aktivität durch den GR kommen.

1.3.2.3 Ausbildung eines inaktiven Komplexes: Interaktion zwischen GR und NF- κ B

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität von Glucocorticoiden reprimiert wird, ist NF- κ B. NF- κ B ist ein Heterodimer aus einer 50-kDa Untereinheit (p50; NF κ B1) und einer 65-kDa Untereinheit (p65; RelA), wobei das p65-Protein aufgrund einer Transaktivierungsdomäne im C-Terminus die transkriptionell aktive Untereinheit darstellt. Zusammen mit anderen homologen Proteinen gehört NF- κ B der NF- κ B/Rel-Familie von Transkriptionsfaktoren an, die an der Aktivierung vieler immunregulatorischer Gene wie beispielsweise Cytokin- und Chemokin-Genen beteiligt sind (zur Übersicht siehe Grimm und Baeuerle, 1993; Verma et al., 1995). Jedes Mitglied dieser Familie hat eine sogenannte Rel-Homologie-Region, die die DNA-Bindung, Dimerisierung und nukleare Translokation des Proteins vermittelt.

Anders als AP-1, das sich konstitutiv im Zellkern befindet, wird NF- κ B in nicht stimulierten Zellen durch Bindung über die Rel-Homologie-Region an inhibitorische Proteine der I κ B-Familie in einer inaktiven Form im Cytoplasma zurückgehalten (zur Übersicht siehe Thanos und Maniatis, 1995; Baeuerle und Baltimore, 1996). Die I κ B-Proteine besitzen sogenannte repetitive Ankyrin-Sequenzen (*ankyrin-repeats*), die durch Interaktion mit NF- κ B dessen nukleares Translokationssignal maskieren (Beg et al., 1992; Beg und Baldwin, 1993). Das I κ B α -Protein dieser Familie spielt dabei vermutlich die bedeutendste Rolle, da in hämatopoetischen Geweben von Mäusen, bei denen das I κ B α -Gen ausgeschaltet wurde, sich NF- κ B verstärkt im Zellkern befindet und NF- κ B-regulierte Gene spontan transkribiert werden (Beg et al., 1995).

Die Induktion von NF- κ B erfolgt durch eine Reihe verschiedener Agenzien, wie beispielsweise doppelsträngige RNA, Phorbolster (z.B. TPA), Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) und Lipopolysaccharide (LPS) (Beg et al., 1993; Liou und Baltimore, 1993). Diese Induktoren führen zu einer Hyperphosphorylierung von I κ B α , was in einer schnellen Degradation dieses Proteins durch Proteolyse resultiert (Alkalay et al., 1995; Lin et al., 1995). Auf diese Weise wird das cytosolische NF- κ B freigesetzt und wandert in den Kern, wo es die Transkription spezifischer Gene durch Bindung an ein definiertes Sequenzmotiv in deren Promotorregion aktiviert (zur Übersicht siehe Beg und Baldwin, 1993). Diese Vorgänge sind in Abb. 3 schematisch dargestellt. Interessanterweise wird die Transkription des I κ B α -

Gen selbst durch NF- κ B positiv reguliert. Dies resultiert in einem negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem neusynthetisiertes I κ B α NF- κ B wieder im Cytoplasma zurückhält und somit dessen Aktivierung beendet (Brown et al., 1993; Le Bail et al., 1993; Sun et al., 1993).

Die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B durch den GR wurde erst vor kurzem genauer beschrieben (Ray und Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b). Diese Daten zeigen, daß die DNA-Bindedomäne des GR für die Repression der NF- κ B-Aktivität notwendig ist, es jedoch unwahrscheinlich ist, daß der Rezeptor in der regulatorischen Region NF- κ B-regulierter Gene bindet. Wie im Falle von AP-1 beschrieben, ist die transkriptionelle Interferenz zwischen GR und NF- κ B wechselseitig und es gibt Hinweise für eine physikalische Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B-Untereinheiten (Scheinman et al., 1995b). Im Gegensatz zur Interferenz mit AP-1 zerstört der GR *in vitro* jedoch die DNA-Bindung von NF- κ B (Scheinman et al., 1995b), die *in vivo*-Signifikanz dieser Daten ist jedoch nicht gezeigt. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß auch die Interferenz zwischen GR und NF- κ B durch die direkte Interaktion beider Proteine zu einem transkriptionell inaktiven Komplex führt (siehe Abb. 3, Modell I). Ob das Transaktivierungspotential von NF- κ B durch Verhindern seiner DNA-Bindung oder durch andere Mechanismen gestört wird, ist jedoch nicht geklärt.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde ein zweiter Mechanismus postuliert, der die Repression der NF- κ B-Aktivität durch den GR erklären könnte (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995a). Diese Untersuchungen zeigen, daß Glucocorticoide die Synthese des Inhibitorproteins I κ B α induzieren können. Das auf diese Weise neusynthetisierte I κ B α könnte NF- κ B wieder im Cytoplasma zurückhalten, was letztendlich dazu führen würde, daß eine Transkription NF- κ B-regulierter Gene nicht mehr stattfindet (siehe Abb. 3, Modell II).

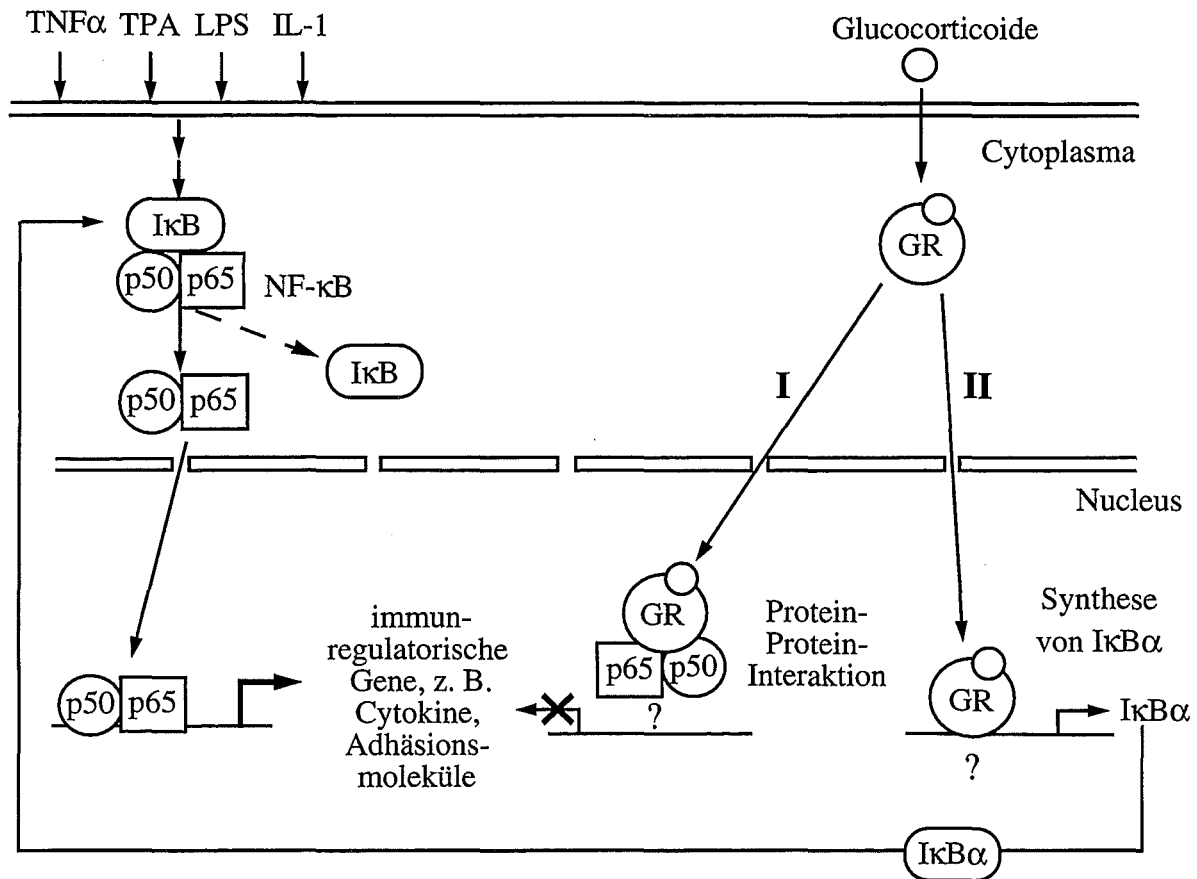


Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Aktivierung von NF- κ B und mögliche Mechanismen der Hemmung seiner Aktivität durch Glucocorticoide. (Erklärung siehe Text.)

Die relative Bedeutung dieser beiden Mechanismen in Bezug auf die Repression der NF- κ B-Aktivität und somit in Bezug auf die anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung von Glucocorticoiden ist nicht geklärt. Erwiesene sich das zuletzt beschriebene Modell als richtig, so würde das bedeuten, daß die genaktivierende Eigenschaft des GR indirekt einen reprimierenden Effekt auf NF- κ B ausübt. Eine strikte Zuordnung der anti-inflammatorischen Effekte von Glucocorticoiden zu der transreprimierenden Eigenschaft des GR wäre somit nicht mehr möglich. Der Versuch, die therapeutische Wirksamkeit von Glucocorticoiden durch Trennung der Funktionen des GR zu verbessern, wäre dadurch erheblich erschwert.

1.4 Fragestellung

Im Hinblick auf die therapeutische Anwendung von Glucocorticoiden als anti-inflammatorische und immunsuppressive Substanzen und der damit verbundenen Nebenwirkungen, ist es von großem Interesse, die diesen Wirkungen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Aufgrund der Hypothese, daß die erwünschten Effekte einer Glucocorticoidtherapie durch Transrepression, die unerwünschten Nebenwirkungen möglicherweise durch Transaktivierung von Genen durch den GR vermittelt werden, war das erste Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob positive und negative genregulatorische Eigenschaften des GR getrennt werden können. Hierzu gab es zwei mögliche Ansätze: Die Verwendung von Rezeptormutanten oder von synthetischen Liganden des GR. Mit Hilfe der synthetischen Liganden des GR sollte desweiteren eine mögliche Korrelation zwischen entzündungshemmender Wirkung von Glucocorticoiden *in vivo* und der transaktivierenden bzw. transreprimierenden Funktion des GR überprüft werden.

Wie die Beschreibung der Transrepression von Genen durch den GR zeigt, ist es schwierig, einen einheitlichen Mechanismus für diese Eigenschaft des GR zu formulieren. Ob dies überhaupt möglich ist und ob der GR für die Repression immunregulatorischer Gene einen einheitlichen Mechanismus benutzt, sollte ein Vergleich verschiedener Modelle der Transrepression unter Verwendung von GR-Mutanten klären.

Unter der Annahme, daß die immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden hauptsächlich durch die Interferenz zwischen dem GR und NF- κ B vermittelt wird, lag der Schwerpunkt des letzten Teils dieser Arbeit auf der molekularen Untersuchung dieser Interferenz. Prinzipiell sollte geklärt werden, welche Bedeutung hierbei einer Glucocorticoid-induzierten Synthese des Inhibitorproteins I κ B α sowie einer physikalischen Interaktion zwischen GR und NF- κ B zukommt.

2 Material und Methoden

Material

2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetyl-Coenzym A (Lithium-Salz)	Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30/0,8)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Agarose (<i>SeaKem LE</i>)	Biozym Diagnostik, Hameln
Aktivkohle	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Aminosäuren-Mix (ohne Methionin)	Promega, Madison, WI, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bakterien-Petrischalen (9cm)	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Coomassie Brillant Blau R250	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg
DEAE-Membran, NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Dexamethason	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dextran	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dialyseschläuche	Bender & Hobein, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
ECL- <i>Western-blotting detection reagents</i>	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
EGTA	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Filterpapier <i>Whatman 3MM</i>	Bender & Hobein, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
L-Glutamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutathion-Agarose	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycylglycin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ham's F-12 Kulturmedium	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Harnstoff	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
HEPES	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Insulin	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Kieselgel-DC-Platten	Macherey-Nagel, Düren

Material und Methoden

Lachsspermien-DNA, Typ III	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lambda DNA	Gibco BRL Life Tech. LTD; Paisley, UK
Lipopolysaccharide (von <i>E. coli</i> , 055:B5)	Calbiochem GmbH, Bad Soden/Taunus
D-Luciferin <i>Firefly</i>	Biosynth AG, Staad, Schweiz
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Methanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Natriumdodecylsulfat	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Nonidet P40	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Nukleotide	
(ATP, dA/G/C/TTP, ddA/G/C/TTP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Nutrient Broth	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Nylon-Membran (<i>Hybond N⁺</i>)	Amersham-Buchler, Braunschweig
17 β -Östradiol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Oligo-dT-Zellulose	Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Phenol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyvinyliden-Difluorid-Membran (<i>ImmobilonTM-P</i>)	Millipore, Bedford, MA, USA
<i>Prime-It II Random Primer Labeling Kit</i>	
2-Propanol	Stratagene GmbH, Heidelberg
Puromycin	Merck, Darmstadt
Quiagen-tip-500-Säulen	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Quarzsand	Diagen GmbH, Hilden
R5020 (Promegeston)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Retikulozytenlysate (aus Kaninchen)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Ribonuklease Inhibitor (<i>RNasin</i>)	Promega, Madison, WI, USA
Rinderserumalbumin	Promega, Madison, WI, USA
Röntgenfilme (<i>HyperfilmTMMP</i>)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
RPMI 1640 Kulturmedium	Amersham-Buchler, Braunschweig
RU486	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Sephadex G-50	Roussel Uclaf, Romainville, Frankreich
<i>Sequenase DNA Sequencing Kit</i>	Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg
Sterilfilter	United States Biochemicals, Cleveland, Ohio
Szintillationsflüssigkeit (<i>Emulsifier-Safe</i>)	Renner GmbH, Dannstadt
<i>TA Cloning Kit</i>	Packard Instr. Comp., Meriden, CT, USA
TEMED	Invitrogen BV, NV Leek, Niederlande
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat	Bio Rad Laboratories GmbH, München
<i>TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-HCl, Tris-Base	Promega, Madison, WI, USA
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween 20	Bio Rad Laboratories GmbH, München
tRNA (aus Hefe)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypsin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tumor-Nekrosis-Faktor α	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Zellkulturartikel	Calbiochem GmbH, Bad Soden/Taunus
ZK-Substanzen	Greiner, Nürtingen
	Schering AG, Berlin

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth GmbH + Co./Karlsruhe, Merck/Darmstadt und Sigma Chemie GmbH/Deisenhofen bezogen.

Radiochemikalien

[³⁵ S] dATPαS	370 MBq/ml
[α- ³² P] dCTP	370 MBq/ml
D-Threo-(dichloracetyl-1- ¹⁴ C-)-Chloramphenicol	7,4 MBq/ml
L-[³⁵ S]-Methionin	370 MBq/ml
¹⁴ C-methylierte Proteine als Molekulargewichts-Standard	185 kBq/ml

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.

Enzyme

Restriktionsendonukleasen: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
 Promega, Madison, WI, USA
 United States Biochemicals, Cleveland, Ohio

modifizierende Enzyme:

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
DNA-Polymerase I (<i>Klenow-Fragment</i>)	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNAse A	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Sequenase</i> (modifizierte Form der T7-DNA-Polymerase)	United States Biochemicals, Cleveland, Ohio
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA
T3 RNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T7 RNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA

2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer für die Erststrangsynthese der menschlichen IL-1β

cDNA (March et al., 1985):

5'-GGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTC-3'

(Nukleotide 783-810 der menschlichen cDNA)

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation der IL-1β cDNA:

5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTCGCCAGT-3'

(Nukleotide 1-27 der menschlichen cDNA)

5'-GGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTC-3'

(Nukleotide 783-810 der menschlichen cDNA)

Primer für die Sequenzierung der IL-1 β cDNA:

T7-Primer: 5'-AATACGACTCACTATAG-3'

SP6-Primer: 5'GATTTAGGTGACACTATAG-3'

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

2.3 Plasmidkonstrukte

Reporter-Plasmide für transiente Transfektionen:

pHCwt CAT (Cato et al., 1988)

Position -235 bis +125 des MMTV-LTR vor dem bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) -Reporter-Gen.

pHCwt Luc (Heck et al., 1997)

450bp langes *HindIII/BglII* Fragment des MMTV-LTR vor dem *Firefly* Luciferase-Reporter-Gen.

5 x TRE TATA CAT (Jonat et al., 1990)

Pentamere AP-1-Bindestelle des menschlichen Kollagenase I-Gens vor einem TATA-Box/CAT-Fusionsgen.

-73/+63 Coll. Luc (Deng und Karin, 1993)

Position -73 bis +63 des menschlichen Kollagenase I-Gens vor dem Luciferase-Reporter-Gen. (Erhalten von A. Helmberg, damals University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA.)

pRLtk Luc

Position -247 bis -214 aus dem Rinder Prolaktin Promotor, welche als nGRE fungiert. Das 0,23 kb lange *HindIII/BglII* Fragment aus dem Plasmid pRL3CAT (Cairns et al., 1993) wurde in das *HindIII/BglII* geschnittene Reporterplasmid pT81Luc (Nordeen, 1988) einligiert. (Erhalten von A.C.B. Cato, IGen, FZK, Karlsruhe.)

pBH Luc 1.3 (Voraberger et al., 1991)

5'flankierende Promotorregion des menschlichen ICAM-1 Gens ab Position -1393 vor dem Luciferase-Reporter-Gen. (Erhalten von C. Stratowa, Bender & Co., Wien, Österreich.)

3Enh-tk Luc (Israel et al., 1992)

Drei Kopien eines synthetischen Oligonukleotids, welches den beiden NF- κ B Bindestellen im HIV1-LTR entspricht, kloniert in einen tk-Luciferase Expressionsvektor. (Erhalten von K. Bender, IGen, FZK, Karlsruhe.)

-158/+11 IL-6 Luc (Stein und Yang, 1995)

Position -158 bis +11 des menschlichen Interleukin-6 Gens vor dem Luciferase-Reporter-Gen. (Erhalten von B. Stein, Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA.)

pGL2 MAD 3-Luc (Le Bail et al., 1993)

Position -623 bis +11 des menschlichen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Gens vor dem Luciferase-Reporter gen.
(Erhalten von A. Israel, Institut Pasteur, Paris, Frankreich.)

Expressionsplasmide für transiente Transfektionen:

pRShR⁻ (Cato und Ponta, 1989)

Kontrollvektor ohne Glucocorticoidrezeptor cDNA-Sequenzen.

phGRSB (Hollenberg und Evans, 1988)

Expressionsplasmid mit der cDNA des menschlichen Wildtyp-Glucocorticoidrezeptors. Die cDNA enthält eine *SacI* und eine *BamHI* Schnittstelle, welche die DNA-Bindedomäne des Rezeptors an Aminosäuren 403 und 532 flankieren.

Glucocorticoidrezeptor-Punktmutanten

Gruppe I: **S425G, L436V, S425G/L436V, C476W/R479Q, R477S, R479G, Y478L/R479G**

Gruppe II: **A458T, N454D/A458T, phGR(D4X)**

Mutante G479R ist in Hollenberg und Evans, 1988 dargestellt. Alle anderen Mutanten sind in Heck et al., 1994 beschrieben und wurden von A.C.B. Cato (IGen, FZK, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Als Ausgangsplasmid für die Einführung der Punktmutationen diente phGRSB. Die Mutanten wurden dann mit Hilfe von mutierten synthetischen Oligonukleotiden mit der Polymerase-Kettenreaktion nach Ho et al., 1989 konstruiert.

Das Expressionsplasmid für die Mutante **pRc/ β act-GR-LS7** (P493R/A494S im Ratten GR) ist in Helmberg et al., 1995 beschrieben und wurde von A. Helmberg (Universität Innsbruck, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Glucocorticoidrezeptor-Deletionsmutanten

Die Expressionsplasmide der Glucocorticoidrezeptor-Deletionsmutanten Δ 9-385, Δ 428-490, Δ 491-515 und Δ 491-777 wurden bereits beschrieben (Hollenberg et al., 1987).

Expressionsplasmide für stabile Transfektion:

Die in der stabilen Transfektion verwendeten Expressionsplasmide wurden von M. Kullmann (IGen, FZK, Karlsruhe) hergestellt und sind in Heck et al., 1997 beschrieben. Es handelt sich hierbei um die cDNA für den Wildtyp-GR der Ratte (**pBGR**), für die Mutante LS-7 (**pBLS-7**), für den menschlichen Wildtyp-GR (**pBGRSB**) und für die Mutante hGR(D4X) (**pBGR(D4X)**) jeweils in dem Expressionsvektor pBABE Puro (Morgenstern und Land, 1990).

Plasmide für *in vitro* Transkription/Translation:

pBK GR

Menschliche Glucocorticoidrezeptor cDNA [2,57 kb *KpnI/DraI*-Fragment aus dem Plasmid pRShGR α (Giguere et al., 1986)] im pBluescript II SK Vektor hinter dem T7 Promotor.

pBAT Δ 9-385, pBAT Δ 428-490, pBAT Δ 491-515, pBAT Δ 491-777

Die cDNAs der Glucocorticoidrezeptor Punkt- und Deletionsmutanten wurden aus den entsprechenden eukaryontischen Expressionsplasmiden (s.o., Ausgangsplasmid phGRSB) in das prokaryontische Expressionsplasmid pBAT kloniert. Hierzu wurde die mutierte cDNA mit *Asp718* und *DraI* aus dem jeweiligen Plasmid isoliert und in den *Asp718* und *SmaI* geschnittenen Vektor pBAT ligiert. Das resultierende Plasmid enthielt die cDNA der jeweiligen GR-Punktmutante direkt hinter dem T3 Promotor.

pBAT Δ 748-777, pBAT Δ 597-777

Die Glucocorticoidrezeptor-Mutanten mit der Deletion Δ 748-777 bzw. Δ 597-777 im prokaryontischen Expressionsvektor pBAT wurden von E. Wade (IGen, FZK, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Die Mutante pBAT Δ 748-777 wurde konstruiert, indem das *KpnI* geschnittene Plasmid pRShGR α (Giguere et al., 1986) mit *EcoRI* partiell verdaut und dann in den *KpnI/EcoRI* geschnittenen Vektor pBAT eingesetzt wurde. Die Mutante pBAT Δ 597-777 wurde konstruiert, indem das *KpnI/PstI* geschnittene Fragment aus dem Plasmid pRShGR α (Giguere et al., 1986) in den *KpnI/PstI* geschnittenen Vektor pBAT ligiert wurde.

Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen:

Die bakteriellen Expressionsplasmide für die GST-Fusionsproteine **GST I**, **GSTp65** und **GSTp50** sind bereits beschrieben (Stein et al., 1993). Sie enthalten entweder keine zusätzliche cDNA (Kontrollplasmid GST I) oder die cDNAs für das menschliche p65 bzw. p50 im Vektor pGEX-1N.

2.4 Sonden für RNA-Hybridisierungen

CAT (bakteriell)

0,56 kb *BglIII/NcoI*-Fragment aus dem Plasmid pHcwt CAT.

GAPDH (Ratte)

1,3 kb *PstI*-Fragment aus dem Plasmid pGAPDH-13 (Fort et al., 1985).

I κ B α (Mensch)

1,6 kb *BglIII/XbaI*-Fragment aus dem Plasmid pECE I κ B α (erhalten von C. Scheidereit, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin).

Interleukin 1 β (IL-1 β ; Mensch)

Um das IL-1 β Fragment für die Hybridisierung zu erhalten, wurde zunächst durch cDNA-Erststrangsynthese und anschließende PCR-Amplifikation die IL-1 β cDNA aus RNA hergestellt. Die poly A⁺RNA stammte aus menschlichen THP-1 Zellen (Monocyten), die für 5 Stunden mit LPS (10 mg/ml) behandelt wurden, um die Transkription von IL-1 β zu induzieren. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer sind oben beschrieben (siehe 2.2). Das Produkt dieser Amplifikation wurde dann in den *EcoRI* geschnittenen Vektor pCRTMII (Invitrogen, San Diego, USA) ligiert (pCRTMIL-1 β). Die Richtigkeit des Plasmids pCRTMIL-1 β wurde durch DNA Sequenzierung überprüft. Für die RNA-Hybridisierung wurde dann das 0,83 kb *EcoRI*-Fragment aus diesem Plasmid verwendet.

Kollagenase I (Mensch)

2.0 kb *HindIII/SalI*-Fragment aus dem Plasmid pCllase-1 (Angel et al., 1987).

Metallothionein IIa (MT IIa; Mensch)

0,4 kb *PstI*-Fragment aus dem Plasmid MT II_a (Karin und Richards, 1982).

Tyrosin-Aminotransferase (TAT; Ratte)

1,02 kb *BamHI/EcoRI*-Fragment, aus dem Plasmid TAT-4 (Scherer et al., 1982)

2.5 Antikörper

anti-GR Antikörper H.H.

Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 305-428 des menschlichen Glucocorticoidrezeptors (zur Verfügung gestellt von M.N. Alexis, Athen, Griechenland).

anti-I κ B α Antikörper C-21

Polyklonale IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuren 297-317 des Carboxy-Terminus des menschlichen I κ B α . Diese Sequenz ist bei Maus und Mensch identisch. (Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Sekundärantikörper für *Western-Blot-Analysen*

Polyklonale IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).

2.6 Bakterien und eukaryontische Zellen

Bakterienstämme

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

Beschrieben in Studier et al., 1990.

E. coli DH 5 α (für Klonierungen)

Genotyp: F⁻, end A1, hsd R17 (r_{k-}, m_{k+}), sup E44, thi-1, λ^- , rec A1, gyr A96, rel A1

Zelllinien und Kulturbedingungen

Cos-7

Affen-Nierenzelllinie; Glucocorticoidrezeptor-defizient. Cos-7 Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) kultiviert.

CV-1

Affen-Nierenzelllinie; Glucocorticoidrezeptor-defizient. CV-1 Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

FTO

Ratten-Hepatom-Zelllinie; FTO Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

HeLa tk⁻

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

HeLa tk⁻/-121 +5 HIV CAT

HeLa tk⁻-Zellklon, stabil mit dem Plasmid -121 +5 HIV CAT (Stein et al., 1989) transfiziert. (Zur Verfügung gestellt von Anke Bonnet, damals IGen, Karlsruhe). Dieser HeLa-Klon wurde unter Selektionsdruck in DMEM mit 10% FCS und 600 µg/ml G418 kultiviert.

LNCaP

Menschliche Prostatakarzinom-Zelllinie; LNCaP-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS kultiviert.

MCF-7

Menschliche Mammakarzinom-Zelllinie; MCF-7 Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

ΩE

Embryonale Maus-Fibroblasten-Zelllinie; Glucocorticoidrezeptor-defizient; geeignet als Verpackungszelllinie für Retroviren (Morgenstern und Land, 1990). ΩE- Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

Die ΩE-Einzelklone **rGR** (II3), **rGR(LS-7)** (II6), **hGR** (II2) und **hGR(D4X)** (I5) wurden freundlicherweise von M. Kullmann (IGen, FZK, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt und sind in Heck et al., 1997 beschrieben. Sie sind mit den Plasmiden pBGR, pBLS-7, pBGRSB bzw. pBGR(D4X) (siehe 2.3) stabil transfiziert und exprimieren den jeweiligen Wildtyp-Glucocorticoidrezeptor bzw. die Rezeptormutante. Diese ΩE-Klone wurden unter Selektionsdruck in DMEM mit 10% FCS und 1 µg/ml Puromycin kultiviert. Ein ΩE-Klon mit stabil transfiziertem "leeren" Expressionsvektor pBABE Puro (Morgenstern und Land, 1990) (Vektor) wurde bei Experimenten mit obigen ΩE-Klonen jeweils als Negativkontrolle verwendet.

T47D

Menschliche Mammakarzinom-Zelllinie; T47D-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und 0,6 µg/ml Insulin kultiviert.

THP-1

Menschliche Monocyten-Zelllinie (Erhalten von G. Duff, University of Sheffield, Sheffield, UK). THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 0,5 mM β -Mercaptoethanol kultiviert.

293

Menschliche embryonale Nierenzelllinie; Glucocorticoidrezeptor-defizient. (Zur Verfügung gestellt von D. Wilhelm, IGen, Karlsruhe). 293 Zellen wurden in DMEM/Ham's F12-Medium (1:1) mit 10% FCS kultiviert.

Die Bakterien und Zelllinien (falls nicht anders vermerkt) stammen aus der Zellbank des Instituts für Genetik (IGen), Forschungszentrum Karlsruhe.

Methoden

Vorbemerkung: Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei Prozentangaben in Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern um Volumenprozent (v/v).

2.7 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren

Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Reinigung einer wässrigen Nukleinsäurelösung von Proteinen wurde zur Lösung (Mindestvolumen von 100 μl) dasselbe Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) gegeben und gut gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde kurz zentrifugiert (10.000 g, 2 min). Proteine sammeln sich zwischen den beiden sich ausbildenden Phasen. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und nochmals abzentrifugiert. Die so gereinigte nukleinsäurehaltige Oberphase wurde dann zur weiteren Verwendung abgenommen.

Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Um Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung zu präzipitieren wurde die Lösung mit 3 M NaAcetat, pH 4,8 auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht, mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und gut gemischt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei -80°C oder für 2 h oder länger bei -20°C . Anschließend wurde das Präzipitat 15 min bei 10.000 g zentrifugiert, mit kaltem 80% Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und im Vakuum (*SpeedVac* Evaporator, Savant, Farmingdale) getrocknet.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde ihre Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer (*Spekol UV/VIS*, Carl Zeiss, Jena) gemessen. Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger Oligonukleotide.

Die Extinktion bei 280 nm zeigt Verunreinigungen durch Proteine an. Im Idealfall sollte das Verhältnis E_{260} zu E_{280} bei DNA etwa 1,8 und bei RNA etwa 2 betragen.

2.8 DNA-Klonierungstechniken

Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Eine Enzymeinheit U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μg DNA des Phagen Lambda (λ) in einer Stunde vollständig verdaut. Für analytische und präparative Zwecke wurde DNA mit 2-3 Einheiten Restriktionsenzym pro μg DNA verdaut. Die Inkubation erfolgte für 3 h bis über Nacht in Gegenwart der vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen (in der Regel 37°C). Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das zehnfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Bei Plasmid DNA aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase A zugesetzt.

Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 bis 2% (w/v) (je nach Größe der DNA-Fragmente). Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,0) versetzt und erhitzt, bis sich die Agarose löste. Nach Abkühlen der Agarose auf ca. 60°C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/ml) wurde das Gel in eine horizontale Kammer gegossen. Dabei wurden mit Hilfe eines Kammes Taschen für das Auftragen der Proben ausgespart. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1 x TBE-Puffer überschichtet und die mit DNA-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 10% Glycerin, 0,1% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) versetzten Proben in die Taschen pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter DNA-Fragmentlängen-Standard (*HindIII* oder *HindIII/EcoRI* gespaltene λDNA) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Danach konnten die Nukleinsäure-Fragmente durch Fluoreszenz unter einem UV-Transilluminator (*IL-350M*, Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Bande eines zu isolierenden DNA-Fragments wurde auf dem Agarosegel unter UV-Licht lokalisiert und mit einem Skalpell ein Schnitt direkt unter die Bande geführt. In diesen Schnitt wurde ein Stück DEAE-Membran eingesteckt. Die Elektrophorese wurde dann solange fortgesetzt, bis das DNA-Fragment vollständig an die Membran gebunden war. Zur Elution der DNA wurde die Membran zerkleinert, in 400 µl DEAE-Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) für 30 bis 60 min bei 65°C inkubiert und gut gemischt. Anschließend wurde die Membran entfernt, eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und das DNA-Fragment zur weiteren Verwendung mit Ethanol gefällt.

Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

DNA-Fragmente, die miteinander verknüpft werden sollten, wurden in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt und mit 3 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10 x Ligasepuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl über Nacht bei 15°C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden 10 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Zur Herstellung einer gewünschten cDNA wurden zunächst 2 µg Poly A⁺ RNA (siehe 2.17) und 1 µg geeigneter Oligonukleotid-Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 5 min auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden der Reaktion 10 µl 5 x AMV-Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA), 10 mM DTT, 1 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 50 U *RNasin* Ribonuklease-Inhibitor und 30 U AMV Reverse Transkriptase zugegeben und das Gesamtvolumen mit Wasser auf 50 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 42°C. Anschließend wurde das Enzym bei 60°C für 30 min denaturiert und der Reaktionsansatz wurde mit H₂O 1:10 verdünnt. In dieser Verdünnung wurde der cDNA-Syntheseansatz für die PCR-Amplifikation eingesetzt.

Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Mit Hilfe von geeigneten Oligonukleotid-Primern wurde mittels PCR aus einem cDNA-Syntheseansatz ein bestimmtes cDNA Fragment amplifiziert. Hierzu wurden 10 µl cDNA Syntheseansatz zusammen mit 10 µl 10 x Taq-Puffer (Promega, Madison, WI, USA), je 10 pmol der beiden Oligonukleotid-Primer, 0,25 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 10 U Taq-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 100 µl in einem Thermocycler (*Perkin Elmer Cetus 9600*, Perkin Elmer, Norwalk, USA) amplifiziert. Die PCR erfolgte durch 40 Zyklen folgender Reaktionsbedingungen: 1 min, 94°C (Denaturierung); 1 min, 55°C (Primerhybridisierung); 3 min, 72°C (Synthese). Das PCR-Produkt wurde dann auf einem Agarosegel aufgetrennt, das cDNA-Fragment isoliert und mit Hilfe des *TA Cloning Kit* in den Vektor pCRTMII (Invitrogen) ligiert.

Präparation von kompetenten Bakterien für die Transformation (nach Hanahan, 1986)

100 ml SOB-Medium (2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α angeimpft und solange bei 37°C geschüttelt, bis die optische Dichte bei 560 nm etwa 0,3 - 0,35 betrug. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde auf Eis vorsichtig in 20 ml kaltem STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM HAcCoCl₃, 10 mM K-Mes pH 6,3, 15% Glycerin) resuspendiert und weitere 20 min auf Eis stehengelassen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 g und 4°C wurden die Bakterien vorsichtig in 4 ml kaltem STB resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden entweder direkt transformiert oder in 200 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Transformation von Bakterien (nach Hanahan, 1986)

Zu 200 µl kompetenten Bakterien wurden auf Eis 10 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42°C und mindestens 1 min auf Eis wurden 3 ml SOC-Medium (2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien für 3 min bei 1000 g zentrifugiert und das Sediment in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Selektivagarplatten (1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium* mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bakterien mit rekombinierter DNA wurden durch Restriktionsanalyse der in kleinem Maßstab präparierten Plasmid-DNA identifiziert.

*LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl

2.9 Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Plasmid-DNA-Präparation in kleinem Maßstab ("Minipräp")

Eine Bakterienkolonie mit dem entsprechenden Plasmid wurde in 2 ml Selektionsmedium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1 ml dieser Bakterienkultur wurde 5 min bei 5000 g zentrifugiert

und das Bakterien-Pellet in 100 µl Lösung A (50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Lösung B (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 150 µl 3 M NaAcetat, pH 4,8 zugesetzt und nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g wurden die Zellfragmente und die chromosomale DNA abgetrennt. Der Überstand wurde Phenol/Chloroform-extrahiert. Die in der wäßrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurden davon 10 µl in einem Restriktionsverdau verwendet.

Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab ("Maxipräp")

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie mit *Quiagen-tip 500*-Säulen. 200 ml einer über Nacht in Selektionsmedium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) inkubierten Bakterienkultur mit dem entsprechenden Plasmid wurden 10 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und anschließend 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml 2,55 M KAc, pH 4,8 zugegeben und anschließend 30 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer *QBT* (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100) äquilibrierte *Quiagen-tip-500*-Säule gegeben, wobei die DNA an die Säulenmatrix bindet. Nach Durchfluß dieses Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer *QC* (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol) gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer *QF* (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8,2, 15% Ethanol) eluiert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g und 4°C pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 80% Ethanol und Trocknen an der Luft wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und die Konzentration bestimmt. Die so präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.10 Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte

Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al., 1977 mit Hilfe eines *Sequenase-Kit* (USB, Cleveland, Ohio, USA).

Zur Denaturierung wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 0,2 N NaOH und 0,2 mM EDTA in einem Volumen von 20 µl bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 2 µl 2 M NH₄-Acetat (pH 4,8) neutralisiert und mit 60 µl Ethanol bei -80°C 10 min gefällt. Nach der Fällung wurde die DNA für 10 min bei 10.000 g abzentrifugiert, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl H₂O gelöst.

Zur Hybridisierung des Primers wurde die vorbereitete Plasmid-Lösung mit 2 µl 5 x *Sequenase*-Puffer (USB, Cleveland, Ohio, USA) und 1 µl geeignetem Primer (1 pmol/µl) gemischt, für 5 min auf 65°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dem Reaktionsansatz wurden dann 2 µl Markierungslösung (1,5 µM dGTP, 1,5 µM dCTP, 1,5 µM

dTTP), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl [³⁵S] dATPαS und 2 µl *Sequenase* (1,5 U/µl) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Termination der Reaktion wurden je 3,5 µl dieser Markierungsmischung in vier (auf 37°C vorgewärmte) *Eppendorf*-Reaktionsgefäße gegeben, in die bereits 2,5 µl der entsprechenden Terminationsmischungen* (mit dem entsprechenden Didesoxy-Nukleotid) vorgelegt wurden. Nach 5 min bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 4 µl einer Stopplösung (95% (w/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol FF) abgebrochen. Diese Stopplösung diente gleichzeitig als Gelladepuffer für die Auftrennung der Reaktionsprodukte.

*Zusammensetzung der Terminationsmischungen:

ddG-Mix: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddGTP, 50 mM NaCl

ddA-Mix: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddATP, 50 mM NaCl

ddT-Mix: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddTTP, 50 mM NaCl

ddC-Mix: 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddCTP, 50 mM NaCl

Auftrennung der Sequenzierreaktionen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden die Reaktionsprodukte aus der Sequenzierung in einem denaturierenden 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gellösung bestand aus 6% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) und 8 M Harnstoff in 1 x TBE (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,0). 40 ml dieser Lösung wurden zur Polymerisation mit 300 µl 10% (w/v) APS und 30 µl TEMED versetzt und zwischen zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit 0,15 mm dicken Abstandshaltern gegossen. Nach Einsetzen eines geeigneten Kammes zum Aussparen der Proben-Taschen und Auspolymerisieren des Gels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Um optimale denaturierende Bedingungen (d.h. Temperaturen um 50°C) im Gel zu erreichen, ließ man das Gel vor dem Auftragen der Proben 30 min bei 1.500 V vorlaufen. Je 3 µl der Proben aus der Sequenzierreaktion wurden 3 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 1.500 V für 1,5 bis 4 h, abhängig von der gewünschten Sequenzinformation. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Glasplatten getrennt, das Gel auf *Whatman 3MM* Papier aufgezogen und auf einem Geltrockner (Bio Rad, München) getrocknet. Das Gel wurde dann über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert.

2.11 Radioaktive Markierung und Reinigung von Sonden für RNA-Hybridisierungen

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für Hybridisierungen wurde nach einer Methode von Feinberg und Vogelstein, 1983 mit Hilfe des *Prime-It II Random Primer Labeling Kit* der Firma Stratagene GmbH, Heidelberg durchgeführt. Hierzu wurden 25 ng DNA-Fragment zusammen mit 10 µl *random primer* in einem Volumen von 35 µl 5 min auf 95°C

erhitzt und bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Dabei trennen sich die beiden Stränge des Fragments und die kurzen Primer-Stücke mit zufälliger Sequenz können sich an die Einzelstränge anlagern. Danach wurden der Reaktion 5 x Reaktionspuffer (mit den notwendigen dNTPs), 3 µl [α - 32 P] dCTP und 2 µl DNA-Polymerase I (*Klenow-Fragment*) zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Hierbei findet ausgehend von den Primern die Synthese des neuen Doppelstranges statt, welcher durch den Einbau des [α - 32 P] dCTP radioaktiv markiert ist.

Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten durch Gelfiltration

Die Reinigung des markierten Fragments von nicht-inkorporierten Nukleotiden erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule. Hierzu wurde ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß, das etwas Quarzsand enthielt und in dessen Boden sich ein kleines Loch befand, mit Sephadex G50 in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) bepackt und kurz bei 2000 g zentrifugiert. Dann wurden auf die Säule 30 µl zerkleinerte denaturierte Lachsspermien-DNA (1 mg/ml) gegeben, 3 min bei 2000 g zentrifugiert, mit TE gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Durchfluß dieser Zentrifugationen wurde jeweils verworfen. Die Säule wurde dann mit der radioaktiven DNA beladen und wiederum 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Freie Radionuklide verbleiben dabei in der Gelmatrix, das markierte DNA-Fragment befindet sich im Durchfluß. Bevor das markierte Fragment als Sonde in einer Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde sein Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Kontron Analytical, Schweiz) bestimmt.

2.12 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen

Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Die Bestimmung der Proteinmenge in Zellextrakten erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Für das Erstellen einer Eichkurve wurden 0, 10, 20, 30, 40, und 50 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit Lowry-Reagenz I (2% (w/v) Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH) auf 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden je 5 µl mit 495 µl Lowry-Reagenz I gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz IV (100 Volumen Lowry-Reagenz I, 1 Volumen 2% (w/v) Na-K-Tartrat, 1 Volumen 1% (w/v) CuSO_4) wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden unter sofortigem Mischen 100 µl 50% Folin-Lösung zugegeben. Nach 3 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurden jeweils 300 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 600 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen (*Multiscan Plus MK II*, Labsystems, Finnland). Anhand der Eichkurve wurde dann die Proteinmenge in den Proben bestimmt.

Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970)

Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 10% Trenngel und einem 5% Sammelgel und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen rundherum mit Agarose abgedichtet. Für eine 10% Trenngel-Lösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS und 10% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1% (w/v) APS und 0,05% TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen. Bis zum Auspolymerisieren des Trenngels wurde es mit Isopropanol überschichtet. Für die 5% Sammelgel-Lösung wurden 125 mM Tris-

HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED versetzt. Das Sammelgel wurde (nach Entfernen des Isopropanols) auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Proben-Taschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Laemmli-Probenpuffer (80 mM Tris pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% Glycerin, 2% β -Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit vorgefärbten Proteinen mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann bei 30 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Wurden ^{35}S -Methionin markierte Proteine aufgetrennt, so wurde das Gel auf *Whatman 3MM* Papier aufgezogen und auf einem Geltrockner (Bio Rad, München) getrocknet. Das Gel wurde dann über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert. Ansonsten wurden nach der Elektrophorese die Proteine im Gel entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt oder auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.18).

Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung wurden Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 15 min in Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau, 50% Methanol und 7,5% Essigsäure) geschüttelt. Die Entfärbung erfolgte in 50% Methanol und 7,5% Essigsäure für mehrere Stunden, bis die Protein-Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel auf *Whatman 3MM* Papier auf einem Geltrockner (Bio Rad, München) getrocknet.

2.13 Zellkultur

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturschalen oder -flaschen kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten an einer Sterilbank (Glatt AG, Schweiz). Medien, Puffer und Glaswaren für die Zellkultur wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C, 1,4 bar, 20 min).

Passagieren von Zellen

Mit Ausnahme der THP-1-Monocyten handelte es sich bei allen verwendeten Zelllinien (siehe 2.6) um adherent wachsende Zellen. Diese Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz von der Kulturschale abgelöst und mit geringerer Dichte (gegebenenfalls für ein Experiment) wieder ausgesät. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Das Medium wurde abgesaugt, die Schale mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und 0,25% Trypsinlösung (0,1 ml/cm Kulturschale) auf die Zellen gegeben. Bis die Zellen sich von der Zellkulturschale ablösten wurde die Schale bei 37°C in den Brutschrank gestellt (1-10 min). Dann wurden die Zellen mit frischem Medium abgespült, resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. THP-1 Zellen wachsen in Suspension, so daß in diesem Falle kein Trypsinieren

notwendig war, sondern ein Teil der Zellsuspension mit frischem Medium verdünnt und rekultiviert werden konnte. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde eine Zellsuspension logarithmisch wachsender Zellen 3 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Einfrier Röhrchen gegeben und mindestens 1 h auf Eis gestellt. Zum Aufbewahren wurden die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren und spätestens nach einer Woche in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in 10 ml warmem Kulturmedium aufgenommen, zentrifugiert (3 min, 500 g) und zur Kultivierung in eine Kulturschale mit Medium gegeben.

Herstellung von CCS (*charcoal calf serum*) für transiente Transfektionen (nach Westley und Rochefort, 1980)

Mit dieser Methode wurde fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) über Aktivkohle gereinigt, um im Serum noch vorhandene Hormone zu entfernen. Bei transienten Transfektionen mit anschließender Hormonbehandlung der Zellen wurde dann CCS an Stelle von FCS im Kulturmedium verwendet. Hierzu wurden 50 ml dextrangebundene Aktivkohle (25 g Aktivkohle, 2,5 g Dextran, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 pro Liter H_2O) für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu diesem Aktivkohlepellet wurde dann 250 ml FCS gegeben, resuspendiert und die Lösung 30 min im 56°C Wasserbad geschüttelt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g wurde diese Behandlung mit dem Überstand der Zentrifugation nochmals wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g wurde das von Hormonen gereinigte Serum sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.14 Transiente Transfektionen

Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode (nach Graham und van der Eb, 1973)

Diese Methode wurde verwendet, um Cos-7, CV-1, LNCaP, MCF-7, ΩE und 293-Zellen zu transfizieren. MCF-7-Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion in phenolrot-freiem DMEM mit 3% CCS kultiviert. Das RPMI-Medium von LNCaP-Zellen wurde für die Transfektion gegen DMEM ausgetauscht. Für alle Transfektionen wurden 7×10^5 Zellen pro 9 cm Kulturschale einen Tag vor der Transfektion in entsprechendem Kulturmedium mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin ausgesät. Direkt vor der Transfektion bis zur Ernte der Zellen wurden, mit Ausnahme der ΩE -Zellen, alle Zelllinien in Medium mit 3% CCS kultiviert. Für die Herstellung des Präzipitats wurden alle Lösungen (außer der DNA) auf 37°C vorgewärmt. Falls nicht anders vermerkt, wurden jeweils 10 μg Plasmid-DNA pro Kulturschale transfiziert. (Betrag die zu transfizierende DNA-Menge weniger als 10 μg , so wurde die Differenz durch Kotransfektion eines "Leervektor"-Kontrollplasmids aufgefüllt.) Die Präzipitatzbildung wurde in einem Volumen von 500 μl pro Kulturschale durchgeführt. Hierzu wurde die DNA zunächst in H_2O gegeben (H_2O -Volumen: 250 μl abzüglich der Volumina der

DNA- und der CaCl_2 -Lösung). Dann wurden 250 μl 2 x HBS (274 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 1,4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM D-Glucose, 40 mM HEPES, pH 7,05) zugegeben und die Lösung gut gemischt. Unter Schütteln wurden dann 25 μl 2,5 M CaCl_2 zugetropft und das Präzipitat für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Präzipitat (500 μl) wurde dann zu 8 ml Medium einer Kulturschale zugetropft und in der Regel 5 bis 6 h auf den Zellen belassen (im Falle der 293-Zellen 16 h). Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen und 8 ml frisches Medium (mit 3% CCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin) zugegeben. Im Falle der CV-1, Cos-7 und LNCaP-Zellen wurden die Zellen vor dem Waschen für 2 min mit 4 ml 15% Glycerin in PBS geschockt. Die Behandlung der Zellen erfolgte im Einzelnen wie im Ergebnisteil angegeben. Zellen, die unbehandelt blieben, erhielten eine entsprechende Menge des Lösungsmittels, in dem der jeweilige Induktor gelöst war. In der Regel wurden die Zellen direkt nach der Transfektion mit den entsprechenden Induktoren behandelt und nach ca. 40 h zur Durchführung der Enzymtests geerntet.

DEAE-Dextran-Methode (nach Kawai und Nishizawa, 1984)

Diese Methode wurde angewendet, um HeLa tk⁻ Zellen transient zu transfizieren. Hierzu wurden 7×10^5 Zellen pro 9 cm Kulturschale einen Tag vor der Transfektion in DMEM, 3% CCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin ausgesät. Pro Kulturschale wurden 5 μg DNA mit 0,5 mg/ml DEAE-Dextran in 1 ml TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,6 mM Na_2HPO_4) gemischt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen. Für die Transfektion wurde dann 1 ml Transfektionsmix pro Schale auf die Zellen gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Schale gelegentlich geschwenkt wurde. Danach wurde zu der Kulturschale mit dem Transfektionsmix 9 ml frisches Medium (DMEM mit 0,5% CCS) gegeben und für 4 bis 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium (DMEM, 3% CCS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin) zugegeben. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen dann mit den entsprechenden Induktoren behandelt und 24 h nach dieser Behandlung geerntet. Zellen, die unbehandelt blieben, erhielten eine entsprechende Menge des Lösungsmittels, in dem der jeweilige Induktor gelöst war.

2.15 Analyse der Genexpression durch den Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivitätstest (Gorman et al., 1982)

Präparation von Proteinextrakten für CAT-Analysen

Die transient mit einem CAT-Reportergen kotransfizierten Zellen einer 9 cm Kulturschale wurden ca. 40 h nach der Transfektion zweimal mit je 8 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 4000 g zentrifugiert und das Zellpellet in 100 μl 250 mM Tris pH 7,8 resuspendiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch fünfmaliges Schockgefrieren im Ethanol/Trockeneisbad und anschließendes Wiederauftauen im 37°C Wasserbad. Die Zelltrümmer wurden für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand nach

Proteinbestimmung (siehe 2.12) direkt für den Enzymtest verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

CAT-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der CAT-Enzymaktivität wurde von allen Proben die gleiche Proteinmenge (60 μg) in die Reaktion eingesetzt. Die entsprechende Menge an Proteinextrakt wurde mit 250 mM Tris, pH 7,8 auf 180 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 μl ^{14}C -Chloramphenicol (Substrat) und 20 μl 4 mM Acetyl-Coenzym A (Acetylgruppen-Donor) wurde gut gemischt und die Reaktion für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat abgestoppt. Durch starkes Mischen wurde das Chloramphenicol und seine acetylierten Produkte aus der wäßrigen Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren für 3 min bei 10.000 g getrennt und die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um das Ethylacetat im Vakuum (*SpeedVac* Evaporator, Savant, Farmingdale) einzutrocknen. Das sedimentierte Chloramphenicol wurde in 15 μl Ethylacetat wieder resuspendiert und tröpfchenweise punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte in einer Glas-Laufkammer mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel für ca. 60 min. Nach Trocknen der DC-Platte an der Luft wurde diese einem Röntgenfilm bei Raumtemperatur über Nacht exponiert.

Die Auswertung des CAT-Tests erfolgte über die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase. Hierzu wurden die bei der Reaktion entstandenen verschiedenen Formen des acetylierten und das nicht acetylierte Chloramphenicol auf der DC-Platte mit Hilfe eines *Phosphoimagers* (PhosphoImager, Fujix BAS 1000) quantifiziert. Der Umsatz an Chloramphenicol wurde als Anteil der acetylierten Formen an der Gesamtmenge eingesetzten Chloramphenicols in % berechnet. Die spezifische Aktivität in pmol Umsatz pro Stunde und μg eingesetztes Protein errechnet sich dann nach folgender Formel:

$$7400 \text{ pmol} \times \text{Umsatz in \%} / 100 \times 2 \text{ h} \times \mu\text{g Protein}$$

2.16 Analyse der Genexpression durch den Luciferase-Aktivitätstest (nach de Wet et al., 1987)

Präparation von Proteinextrakten für Luciferase-Analysen

Die transient mit einem Luciferase-Reportergen kotransfizierten Zellen einer 9 cm Kulturschale wurden nach ihrer Behandlung mit Induktoren zweimal mit PBS ohne Kalzium und Magnesium (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen, 400 μl eiskalter Lysispuffer (0,1 M Tris-Acetat pH 7,5, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100) zugegeben und die Schalen für 15 min unter gelegentlichem Schwenken bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen im Lysispuffer mit einem Gummischaber auf Eis abgeschabt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Nach starkem Mischen wurde das Zellysate zum Abtrennen der Zelltrümmer 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, seine Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.12) und direkt für den Enzymtest verwendet.

Luciferase-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Luciferase-Enzymaktivität wurde von allen Proben die gleiche Proteinmenge (200 μg) in die Reaktion eingesetzt. Hierzu wurde pro Probe die entsprechende

Menge an Proteinextrakt mit 350 µl Reaktionspuffer (25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT, pH 7,8) und 100 µl Luciferin-Lösung (Substrat) (0,2 mM Luciferin in 25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, pH 7,8) versetzt. Das bei dieser Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin freigesetzte Licht wurde dann für 10 sec bei 560 nm in einem Luminometer (*Lumat LB9501*, Berthold) gemessen und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferase-Aktivität dokumentiert.

2.17 Analyse von RNA durch Transfer auf Membranen und Detektion durch radioaktiv markierte DNA-Fragmente (*Northern-Blot*)

Präparation von poly A⁺ RNA aus Zellen

Zur Präparation von poly A⁺ RNA aus Zellen wurden je 3 x 10⁶ Zellen auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät, für 24 h in ihrem entsprechenden Medium wachsen gelassen und dann für 24 h in Medium mit 0,5% FCS gehungert. Danach wurden die Zellen mit den angegebenen Induktoren behandelt, wobei Zellen, die unbehandelt blieben, eine entsprechende Menge des Lösungsmittels erhielten, in dem der jeweilige Induktor gelöst war. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und in 10 ml sterilem STE (20 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS, 300 µg/ml Proteinase K) abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA der Zellen wurde mit Hilfe eines *Ultra-Turax*TM-Homogenisators (Janke u. Kunker GmbH & CoKG, Staufen) für 30 sec geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Endkonzentration von NaCl auf 0,5 M gebracht wurde, wurde pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS) zugegeben. Unter ständigem Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur konnte die poly A⁺ RNA an die Oligo-dT-Zellulose binden. Die Oligo-dT-Zellulose wurde dann durch wiederholtes Zentrifugieren für 2 min bei 1000 g dreimal mit HSB gewaschen. Die Elution der poly A⁺ RNA erfolgte danach ebenfalls durch Zentrifugieren dreimal mit 1 ml und einmal mit 0,5 ml H₂O. Zur vollständigen Entfernung der Oligo-dT-Zellulose wurden die 3,5 ml eluierte poly A⁺ RNA nochmals für 5 min bei 2000 g abzentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde mit 500 µl des Eluats spektralphotometrisch bestimmt (siehe 2.7). Die verbleibenden 3 ml RNA wurden mit 3 M NaAc pH 4,8 auf eine Endkonzentration von 0,2 M NaAc gebracht und zusammen mit HefetRNA (1 µg/ml) als Fällungshilfe und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA bei 10.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, das Pellet an der Luft getrocknet und in H₂O resuspendiert (in der Regel zu einer Konzentration von 0,5 µg/µl). Die RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1% horizontalen Agarosegelen. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAcetat, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 5 µl Ethidiumbromid und 5 ml Formaldehyd (37%) gemischt. Das Gel wurde in eine horizontale Kammer gegossen, wobei mit Hilfe eines Kammes Taschen für das Auftragen der Proben ausgespart wurden. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer. 5 µg poly A⁺ RNA wurden dann in 20 µl RNA-Probenpuffer (17,6% Formaldehyd, 50% rekristallisiertes Formamid, 5% Glycerin, 0,05%

(w/v) Bromphenolblau in MOPS-Puffer) 10 min auf 55°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 8 cm weit gewandert war. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel unter einem UV-Transilluminator (*IL-350M*, Bachofer, Reutlingen) photographiert und die Lage der 28s und 18s ribosomalen RNA markiert, bevor es zur weiteren Analyse der RNA für den *Northern-Blot* verwendet wurde.

Northern-Blot und Hybridisierung

Der Transfer von aufgetrennter RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran (*Hybond N⁺*) erfolgte durch Kapillarkräfte. Hierzu wurden in einer Wanne mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7) drei Lagen *Whatman 3MM*-Papier (in 20 x SSC getränkt) auf einer Glasplatte so angeordnet, daß die Enden der Papierlagen in das SSC getaucht waren. Darauf wurde das Gel gelegt, auf das Gel luftblasenfrei die Nylonmembran und auf diese wiederum drei Gelstück-große Lagen *Whatman 3MM*-Papier. Diese Anordnung wurde mit einem Stapel Zellstoff überschichtet und mit einem Gewicht beschwert, so daß durch die Kapillarkräfte die Flüssigkeit nach oben gesaugt und dadurch die RNA auf die Membran übertragen wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Nach beendetem Transfer wurde auf der Membran die Position der Probestaschen und der 28s und 18s ribosomalen RNA markiert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht für 35 sec in einem *Stratalinker 2400* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) wurde die RNA kovalent an die Membran fixiert.

Zur Detektion einer bestimmten *messenger* RNA wurde die Membran mit einem für die mRNA spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Fragment hybridisiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Vorhybridisierung der Membran für 2 h im 65°C-Wasserbad in 200 ml Vorhybridisierungs-Lösung (4 x SSC, 3,3% PiPPi*, 1 x Denhard's Lösung**, 0,1% (w/v) SDS). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde in der zweiten Stunde der Prähybridisierung zerkleinerte denaturierte Lachsspermien-DNA zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben. Für die Hybridisierung wurde die Membran dann luftblasenfrei in einen Plastikbeutel mit Hybridisierungs-Lösung eingeschweißt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Hybridisierungs-Lösung enthielt in der Regel 3 x 10⁶ cpm/ml der radioaktiv markierten DNA-Sonde (siehe 2.11) (10 min bei 95°C denaturiert) in 4 x SSC, 10 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS und 20 µg/ml Lachsspermien-DNA. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran nach der Inkubation unter Schütteln bei 65°C jeweils 30 min in Waschlösung 1-4*** gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit einer Verstärkerfolie einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

Bevor die Membran für eine weitere Hybridisierung mit einer anderen Sonde verwendet werden konnte, wurde die ursprüngliche Sonde durch Kochen der Membran in 0,1% SSC/0,1% SDS entfernt. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

*PiPPi: 1,5% Na₄P₂O₇, 200 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na₂HPO₄, pH 7,3

**50 x Denhard's-Lösung: 1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% (w/v) BSA

***Waschlösung 1: 2 x SSC, 3,3% PiPPi, 0,1% (w/v) SDS

Waschlösung 2 und 3: 1 x SSC, 3,3% PiPPi, 0,1% (w/v) SDS

Waschlösung 4: 0,5 x SSC, 3,3% PiPPi, 0,1% (w/v) SDS

2.18 Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (*Western-Blot*)

Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den *Western-Blot*

Für *Western-Blot*-Analysen wurden am Vortag je 5×10^5 Zellen in ihrem jeweiligen Medium auf 5 cm Kulturschalen ausgesät (LNCaP- und T47D-Zellen mit 3% CCS; MCF-7-Zellen wurden zuvor schon zwei Tage in Phenolrot-freiem DMEM mit 3% CCS kultiviert, was zum Aussäen und bis zur Ernte der Zellen beibehalten wurde). Die Zellen wurden dann für die angegebenen Zeiten mit den im Einzelnen angegebenen Induktoren behandelt, wobei Zellen, die unbehandelt blieben, eine entsprechende Menge des Lösungsmittels erhielten, in dem der jeweilige Induktor gelöst war. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und als Lysispuffer 400 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer (0,16 M Tris pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% Glycerin, 4% β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 10 min unter gelegentlichem Schwenken wurde das Zellysate abgeschabt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zum Scheren der DNA wurden die Proben sonifiziert (*Branson Sonifier*, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) und die Zelltrümmer 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert. Zur Analyse dieses Proteinextraktes wurden ca. 50 µl jeder Probe (gleiche Proteinkonzentration) in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.12) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde ein Teil des Gels, der nicht auf eine Membran transferiert werden sollte, mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 2.12), um zu bestätigen, daß bei unterschiedlichen Proben jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Der das zu analysierende Protein enthaltende Gelbereich wurde für den *Western-Blot* verwendet.

Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransfer-Kammer (*Trans-Blot*, Bio Rad, München) auf eine PVDF-Membran (*Immobilon™-P*) übertragen. Zuvor wurde die Membran ca. 1 min in Methanol aktiviert und anschließend 10 min gewässert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran dann direkt zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je drei Lagen *Whatman 3MM*-Papier feucht in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10% Methanol) zusammengebaut. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt, so daß die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 300 mA.

Nach beendetem Transfer wurde die Membran (mit den gebundenen Proteinen) kurz in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2-16 h bei Raumtemperatur in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran kurz in PBS gewaschen, mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000 verdünnt in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20) luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min in PBS mit 0,3% Tween 20 gewaschen und mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:3000 verdünnt in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20) analog zur ersten Hybridisierung für 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS mit 0,3% Tween 20 wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Diese Detektion basiert auf der Oxidation eines Substrates, bei der Licht freigesetzt wird und die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid von Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Hierzu wurde die Membran mit 3 ml einer frisch bereiteten 1:1-Mischung der ECL *Western-Blot* Nachweisreagenzien (Amersham, RPN 2106) beschichtet und in Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde dann so lange ein Röntgenfilm exponiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

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

In vitro Transkription/Translation

Um radioaktiv markierte Glucocorticoidrezeptor-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 H₂O mit folgenden Komponenten für 90 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 cDNA enthaltendes Plasmid

[cDNAs im pBluescript II SK Vektor wurden mit T7 RNA-Polymerase transkribiert, cDNAs im pBAT Vektor mit T3 RNA-Polymerase.]

Anschließend wurden die *in vitro* synthetisierten Glucocorticoidrezeptor-Proteine vor dem Interaktionstest durch Inkubation mit Dexamethason (10⁻⁷ M Endkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur und 15 min auf Eis in einen aktiven Zustand gebracht.

Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) 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 (Smith und Johnson, 1988). Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellem Rohlysat mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins ist hierzu in einem speziellen Vektor an das 3'-Ende des GST-Gens kloniert. Zur Expression der Plasmide wurde der *E. coli* Stamm BL21 verwendet, der mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert war.

100 ml einer stationären Kultur dieses Bakterienstammes wurde 1:10 mit TY-Selektionsmedium (1% Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Trypton, 1% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) auf 1 Liter verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Expression des Fusionsproteins in den Bakterien durch Zugabe von 0,1 M IPTG induziert und die Bakterien weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10

min bei 3000 g und 4°C sedimentiert und in 10 ml PBS ohne Kalzium und Magnesium (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) mit 2 mM EDTA und 2 mM PMSF resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch sonifizieren (*Branson Sonifier*, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) wurden die Zellen aufgebrochen und die bakterielle DNA geschert. Nach Zugabe von 1% Triton X-100 wurden unlösliche Bakterienbestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und 4°C entfernt. Die Fusionsproteine im Überstand wurden dann zur Kopplung an Glutathion mit 4 ml in PBS gequollener Glutathion-Agarose (1:1 in PBS ohne Kalzium und Magnesium) für 1 h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml eiskaltem PBS (ohne Kalzium und Magnesium) wurde die Glutathion-Agarose mit den gebundenen Fusionsproteinen auf eine Säule transferiert. Das Fusionsprotein wurde dann mit 9 ml 5 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris pH 8,0) in 1 ml Fraktionen bei 4°C aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.12) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 2.12) überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen PBS bei 4°C dialysiert. Nach der Dialyse wurde eine Probe des Fusionsproteins zur Konzentrationsbestimmung nochmals in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit definierten Mengen BSA als Standard aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Durch Vergleich der Bandenintensitäten wurde die Konzentration des Fusionsproteins bestimmt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde dann mit 10% Glycerol und 1 mM DTT versetzt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

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 an immobilisiertes Glutathion zunutze. 20 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurden an 40 µl Glutathion-Agarose (1:1 in PBS ohne Kalzium und Magnesium mit 1% Triton X-100) in einem Mindestvolumen von 800 µl (PBS mit 10% Glycerol, 1 mM DTT) für 20 min bei Raumtemperatur und 1 h bei 4°C unter Rotieren gebunden. Anschließend wurde die Glutathion-Agarose durch wiederholtes Zentrifugieren für 10 sec bei 10.000 g dreimal mit kaltem PBS und zweimal mit kaltem LBST-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,05% NP40, 1,5% Triton X-100) gewaschen. Die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Agarose wurde dann mit 10 µl des entsprechenden *in vitro* translatierten, ³⁵S-markierten Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl LBST-Puffer, 1 mM DTT, 1 mM PMSF gemischt. Unter Rotieren für 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 4°C wurde eine Interaktion zwischen den beiden Proteinpartnern ermöglicht. Daraufhin wurde die Glutathion-Agarose nochmals durch wiederholtes Zentrifugieren für 10 sec bei 10.000 g viermal auf Eis mit kaltem LBST-Puffer gewaschen. Die an das Glutathion gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zugabe von 25 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer (160 mM Tris, pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% Glyzerin, 4% β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau), Mischen und Erhitzen für 10 min bei 95°C von der Glutathion-Agarose eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.12) mit anschließender Autoradiographie bei -80°C.

3 Ergebnisse

Die Hemmung der Genexpression (Transrepression) durch Glucocorticoide wird mit deren entzündungshemmender und immunsuppressiver Wirkung in Verbindung gebracht und ist deshalb eine wichtige Eigenschaft des Glucocorticoidrezeptors (GR). Unter diesem Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit die genreprimierende Eigenschaft des menschlichen Glucocorticoidrezeptors genauer charakterisiert. Hierzu wurde zunächst mit zwei verschiedenen Ansätzen gezeigt, daß Transaktivierung und Transrepression zwei unterschiedliche Funktionen des GR sind und getrennt werden können.

Im ersten Teil der Arbeit wurde dies durch Verwendung von Rezeptor-Mutanten erreicht. Mit Hilfe dieser "dissoziierenden" Mutanten wurde dann die reprimierende Wirkung des GR auf verschiedene Transkriptionsfaktoren und an verschiedenen Zielgenen verglichen, um zu klären, ob ein einheitlicher Mechanismus für die Repression verschiedener Gene existiert.

Ein weiterer Ansatz zur Unterscheidung der verschiedenen Aktivitäten des GR ist im zweiten Teil der Arbeit dargestellt. Hier wurde die genaktivierende und -reprimierende Eigenschaft des Rezeptors unter Verwendung synthetischer Liganden des GR getrennt und untersucht, ob eine dieser Eigenschaften mit der anti-inflammatorischen Wirkung dieser Liganden korreliert werden kann.

Bei der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden spielt die Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den GR die wohl entscheidendste Rolle. Deshalb wurden im dritten Teil dieser Arbeit u.a. die in den ersten beiden Abschnitten gewonnenen Erkenntnisse mit GR-Mutanten und -Liganden angewendet, um die molekularen Mechanismen der Hemmung von NF- κ B genauer zu charakterisieren.

3.1 Trennung von Transaktivierung und Transrepression mit Hilfe von Mutanten des GR und Vergleich seiner transreprimierenden Aktivität an verschiedenen Zielgenen

3.1.1 Zur Unterscheidung von Transaktivierung und Transrepression verwendete Mutanten

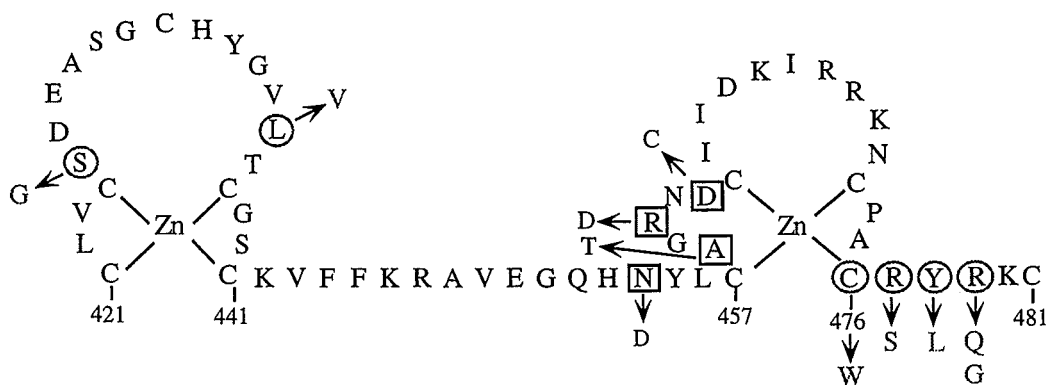
In vorangegangenen Untersuchungen (Lucibello et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Kerppola et al., 1993; Heck, 1993) wurde durch Mutationsanalysen gezeigt, daß die zentral gelegene DNA-Bindedomäne (DBD) des GR eine entscheidende Rolle bei der Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 und AP-1-regulierter Gene spielt. Die DNA-Bindedomäne ist jedoch auch notwendig für die Dimerisierung von Rezeptormolekülen, für ihre Bindung an die DNA und folglich auch für die Transaktivierung von Genen durch den GR (zur Übersicht siehe Beato, 1989; Cato et al., 1992a). Durch eine Mutationsanalyse des GR sollten

Ergebnisse

deshalb in diesem Bereich bestimmte Sequenzen identifiziert werden, die wichtig für die Transrepression bzw. Transaktivierung sind und durch deren Mutation diese beiden Aktivitäten des GR voneinander getrennt werden können.

Hierzu wurden zwei Gruppen von Punktmutanten in der DNA-Bindedomäne des GR verwendet. Sie sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Benennung der Mutanten erfolgte nach der alten Aminosäure, die der entsprechenden Stelle im Wildtyp-GR entsprach, gefolgt von der Position im GR an der der Austausch stattfand, gefolgt von der neuen Aminosäure an der mutierten Position. So wurde beispielsweise in S425G ein Serin (S) an Position 425 im Wildtyp-GR durch ein Glycin (G) ersetzt. Doppelmutanten wurden durch einen Schrägstrich gekennzeichnet. Eine Ausnahme bei der Benennung bildet die Mutante phGR(D4X). Bei ihr wurden insgesamt vier Aminosäurepositionen mutiert.

A



B

421	441	457	476	481	
CLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEGQHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPCRYRKC					hGR wt
-----G-----					hMR wt
Gruppe I:					
-----G-----					S425G
-----V-----					L436V
-----G-----V-----					S425G/L436V
-----W-----Q-----					C476W/R479Q
-----S-----					R477S
-----G-----					R479G
-----L-----G-----					Y478L/R479G
Gruppe II:					
-----T-----					A458T
-----D-----T-----					N454D/A458T
-----D-----T-----D-----C-----					phGR(D4X)

Abb. 4: Schematische Darstellung des Zinkfinger-Bereiches der DNA-Bindedomäne und der verwendeten Punktmutanten des GR. In (A) sind die zwei Zinkfinger des menschlichen GR im Einbuchstabencode der Aminosäuren 421-481 schematisch dargestellt. Die Zahlen bezeichnen die Positionen der Aminosäuren. Die mit einem Kreis umrandeten Aminosäuren wurden bei den Mutanten der Gruppe I ausgetauscht, die quadratisch umrandeten bei den Mutanten der Gruppe II. In (B) ist dieser Bereich im Einbuchstabencode der Aminosäuren linear dargestellt. Gezeigt ist untereinander die Wildtyp-Sequenz des menschlichen GR und des menschlichen MR, sowie eine Liste der verwendeten Mutanten. Striche zeigen an, daß an dieser Stelle die gleiche Aminosäure vorliegt wie im Wildtyp-GR. Bei Abweichungen von der Wildtyp-GR-Sequenz ist an dieser Position die Aminosäure angegeben. Die Benennung der Mutanten ist im Text erklärt.

Gruppe I der Mutanten besitzt Aminosäure-Austausche an bestimmten Positionen in den zwei Zinkfinger-Strukturen der DBD des GR, aber außerhalb der sogenannten Dimerisierungsdomäne (Aminosäuren 458-462). Die Überlegung zur Herstellung dieser Mutanten basierte auf der Beobachtung, daß der Mineralocorticoidrezeptor (MR) ein schlechter Repressor der AP-1-Aktivität ist, sich jedoch innerhalb der DBD in nur vier Aminosäuren von der Sequenz des GR unterscheidet (siehe Abb. 4B). Da die DBD wichtig für die Transrepression ist, lag die Vermutung nahe, daß diese Sequenzen möglicherweise an der Repression beteiligt sind. Deshalb wurden bei den Gruppe I-Mutanten genau diese vier Positionen entweder einzeln oder in Kombination mutiert. Bei der Mutagenese entstanden durch einen Fehler der *Taq*-Polymerase zusätzlich zwei weitere Mutationen (C476W/R479Q und R477S), die sich an interessanten Positionen befinden, weshalb die resultierenden Rezeptor-Mutanten ebenfalls für die folgenden Analysen verwendet wurden.

Gruppe II der Mutanten besitzt Punktmutationen in der Dimerisierungsdomäne (Aminosäuren 458-462) innerhalb der DBD. (Bei zwei dieser Mutanten wurde während der Mutagenese ebenfalls durch einen Fehler der *Taq*-Polymerase noch zusätzlich eine Aminosäure an Position 454 außerhalb der Dimerisierungsdomäne ausgetauscht.) Die Idee zur Herstellung der Gruppe II-Mutanten basierte auf der Beobachtung, daß der Bereich mit den Aminosäurepositionen 458-462 an der Basis des zweiten Zinkfingers wichtig für die Dimerisierung des GR ist (Umesono und Evans, 1988; Dahlman-Wright et al., 1991). Mutationen in dieser Dimerisierungsdomäne sollten letztendlich die transaktivierende Eigenschaft des GR behindern. In einer vorangegangenen Untersuchung wurde beschrieben, daß eine einzelne Mutation in diesem Bereich von Alanin zu Threonin im Androgenrezeptor (AR) (entsprechend der Position 458 im GR) zu einer Mutante führt, deren Fähigkeit zur Dimerisierung, DNA-Bindung und Transaktivierung stark verringert ist (Kaspar et al., 1993).

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die Gruppe I- und Gruppe II-Mutanten in ihrer transaktivierenden und/oder transreprimierenden Eigenschaft beeinträchtigt sind und ob sie sich dadurch zur Unterscheidung dieser beiden Rezeptorfunktionen eignen. (Die Ergebnisse zur Analyse der transaktivierenden Eigenschaften der Rezeptor-Mutanten wurden von A.C.B. Cato zur Verfügung gestellt. Sie werden in dieser Arbeit einleitend nochmals wiedergegeben, da sie grundlegend für alle weiteren Untersuchungen sind.)

3.1.2 Transaktivierende Eigenschaften der Gruppe I und Gruppe II-Mutanten

Der Mechanismus der Transaktivierung von Genen durch den GR ist relativ gut charakterisiert. Sie erfolgt ausschließlich durch Bindung von Rezeptor-Homodimeren an klassische GREs in der Promotorregion von Zielgenen und anschließende Kommunikation mit der Transkriptionsmaschinerie (siehe Kapitel 1). Ein sehr gut untersuchtes Modell für diesen Mechanismus der positiven Genregulation durch den GR ist der *Long Terminal Repeat* (LTR)-Promotor des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV), der ein auf Hormone reagierendes Element (HRE) mit vier Rezeptor-Bindestellen enthält. Zur Analyse der Transaktivierung wurde deshalb das MMTV-Reporterplasmid pHCwt-CAT zusammen mit den jeweiligen Rezeptor-Expressionsplasmiden in CV-1-Zellen (Affen-Nierenzellen), die selbst keinen endogenen GR enthalten, transient transfiziert. Durch Messung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität wurde getestet, ob die Rezeptormutanten in Anwesenheit des synthetischen Glucocorticoidhormons Dexamethason zur Induktion der Genexpression in der Lage sind. (Dexamethason ist dem physiologischen Cortisol sehr ähnlich, wird jedoch nicht metabolisiert.) Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente.

Sowohl der Wildtyp-GR (phGRSB), als auch die Mutanten der Gruppe I mit MR-ähnlichen Austauschungen zeigten im Vergleich zum Kontrollvektor (Vektor) eine gute Transaktivierung des Reportergens (mit der Ausnahme C476W/R479Q; Abb. 5). Dies war zu erwarten, da der MR ebenfalls als Transkriptionsfaktor Gene aktivieren kann. Einige der Mutanten konnten sogar besser transaktivieren, als der Wildtyp-GR. Mutante C476W/R479Q, bei der eines der koordinierenden Cysteine des zweiten Zinkfingers ausgetauscht ist, hat als einzige Mutante dieser Gruppe I die Fähigkeit zur Transaktivierung komplett verloren. Diese Mutante ist auch nicht mehr in der Lage, an DNA zu binden (A.C.B. Cato, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zur Gruppe I waren die drei mutierten Rezeptoren der Gruppe II im Vergleich zum Wildtyp-GR (phGRSB) bis auf eine geringe Restaktivität nicht mehr in der Lage, das Reportergen zu aktivieren (Abb. 5). Die eingeführten Mutationen verhinderten die Dimerisierung der Rezeptorproteine, so daß die Mutanten auch nicht mehr an DNA binden konnten (Heck et al., 1994), was eine Voraussetzung für die Transaktivierung ist. Dies bestätigt die Vermutung, daß die Aminosäuren 458-462 in der DBD des GR an der Transaktivierung durch den Rezeptor beteiligt sind.

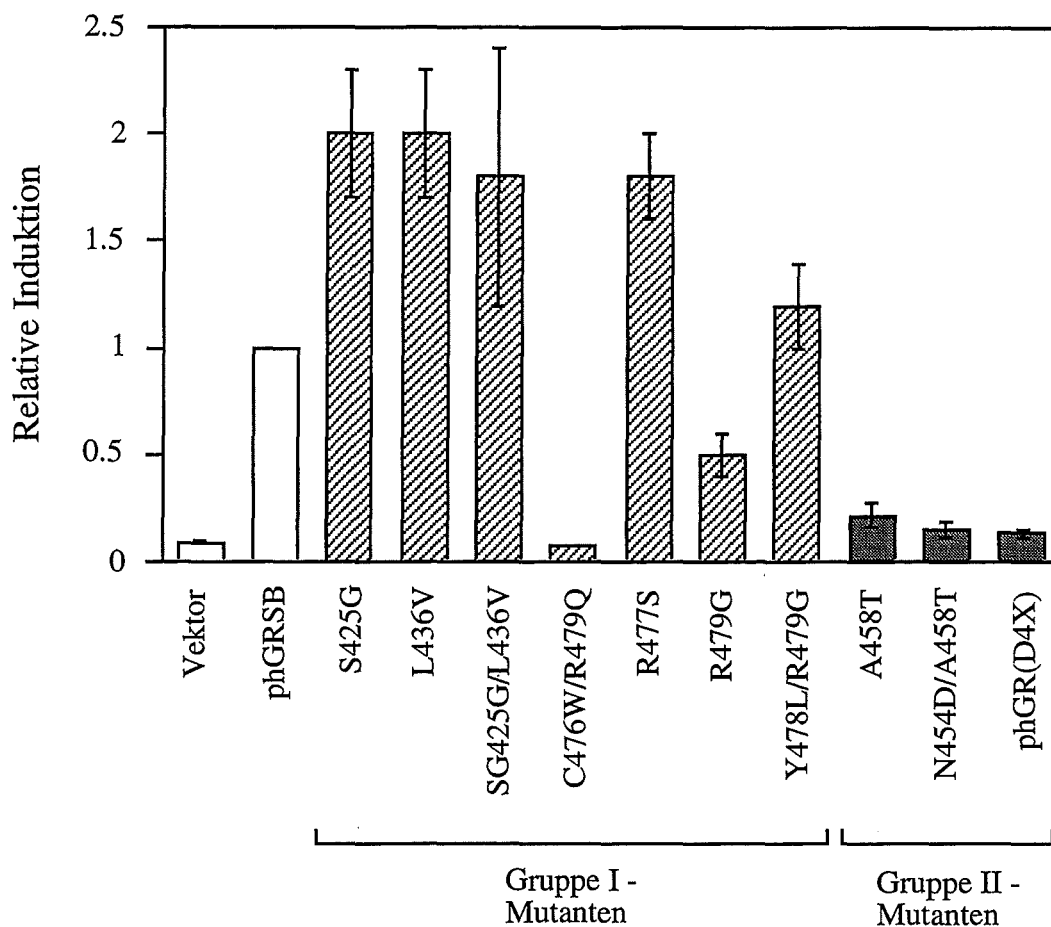


Abb. 5: Mutationen in der Dimerisierungsdomäne beeinträchtigen die transaktivierende Eigenschaft des GR. CV-1-Zellen wurden mit jeweils 9 µg des MMTV-Reportergens pHCwt-CAT und 1 µg des leeren Expressionsvektors (pRShR⁻), bzw. des Expressionsplasmides für den Wildtyp-GR (phGRSB) oder des jeweiligen Rezeptormutanten-Expressionsplasmides kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder nicht oder mit Dexamethason (10^{-7} M) für 38 h behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität mit jeweils 60 µg Protein bestimmt. Dargestellt ist der relative Grad der Induktion der Reportergen-Expression durch die hormonaktivierten Rezeptoren. Die Induktion ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der in Anwesenheit von Dexamethason und der ohne Hormon gemessenen CAT-Aktivität. Dieser Faktor wurde im Falle des Wildtyp-GR (phGRSB) dem Wert 1 gleichgesetzt und die Induktion durch die mutierten Rezeptoren bzw. durch den Kontrollvektor relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Induktionen als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der transaktivierenden Eigenschaften der GR-Mutanten ergab also, daß zwar die Gruppe I-Mutanten ebenso wie der Wildtyp-GR, nicht jedoch die dimerisierungsdefekte Gruppe II-Mutanten noch zur Induktion der Genexpression in der Lage sind. Nachfolgend wurde nun untersucht, wie sich diese Mutationen auf die Fähigkeit der Rezeptoren zur Transrepression auswirken.

3.1.3 Mutationen in der Dimerisierungsdomäne beeinträchtigen nicht die Fähigkeit des GR, die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 zu reprimieren

Im Gegensatz zur Transaktivierung von Genen ist der Mechanismus der Transrepression durch den GR weniger gut charakterisiert. Bislang ist noch nicht geklärt, ob, wie im Falle der Transaktivierung, die Repression ebenfalls nach einem einheitlichen Mechanismus erfolgt. Das bisher am besten untersuchte Modell, um den Mechanismus der negativen Genregulation zu analysieren, ist die Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1 und somit AP-1-regulierter Gene durch den GR.

Deshalb wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der transreprimierenden Eigenschaften der GR-Mutanten zunächst untersucht, ob sie in der Lage sind, die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 zu reprimieren. Hierzu wurde das durch AP-1-induzierbare Reportergen 5x TRE TATA CAT (mit fünf AP-1-Bindestellen) zusammen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden der Gruppe I und II-Rezeptoren transient in CV-1 Zellen transfiziert. Die AP-1-Aktivität in den transfizierten Zellen wurde durch den Phorbolster TPA induziert. Zur Aktivierung der Rezeptorproteine wurden die transfizierten Zellen mit Dexamethason behandelt. Die Hemmung der AP-1-induzierten Reportergen-Expression durch die Rezeptoren wurde mit Hilfe der CAT-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente sind in Abb. 6 dargestellt. (Die Ergebnisse mit den Gruppe I-Mutanten wurden bereits beschrieben (Heck, 1993) und sind hier aus Gründen der Verständlichkeit nochmals wiedergegeben.)

Im Vergleich zum Kontrollvektor (Vektor) reprimierte der Wildtyp-GR (phGRSB) die Expression des AP-1-abhängigen Reportergens um 60-70% (Abb. 6). Die Mutanten S425G/L436V, R477S und R479G zeigten, wenn auch teilweise schwächere, transreprimierende Aktivität. Einige der Mutanten der Gruppe I (S425G, L436V, C476W/R479Q und Y478L/R479G) konnten dagegen eindeutig die AP-1-Aktivität nicht reprimieren, obwohl sie (mit Ausnahme von C476W/R479Q) zur Aktivierung der Genexpression in der Lage waren (siehe 3.1.2). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese Aminosäure-Sequenzen an der Repression beteiligt sein könnten und ihre Mutation sich zur Unterscheidung zwischen transaktivierender und transreprimierender Eigenschaft des GR eignet.

Bei der Gruppe II konnten alle mutierten Rezeptoren die AP-1-abhängige Reportergen-Aktivität reprimieren (Abb. 6), in einem Falle etwas schwächer (A458T), teilweise aber sogar besser als der Wildtyp-GR (phGRSB). Die zusätzliche Mutation außerhalb der Dimerisierungsdomäne verbesserte die Fähigkeit der resultierenden Rezeptoren, die AP-1-Aktivität zu hemmen (vergleiche A458T mit N454D/A458T und phGR(D4X)). Im vorangegangenen Kapitel (3.1.2) wurde gezeigt, daß diese mutierten Rezeptoren, vermutlich als Folge ihrer defekten Dimerisierungsdomäne, ihre Fähigkeit zur Aktivierung der Genexpression verloren haben. Die Mutationen der Gruppe II zerstören demnach das Transaktivierungspotential des GR, ohne

jedoch seine Fähigkeit zur Transrepression zu behindern, weshalb sie ebenfalls dazu geeignet sind, beide Rezeptoreigenschaften zu trennen.

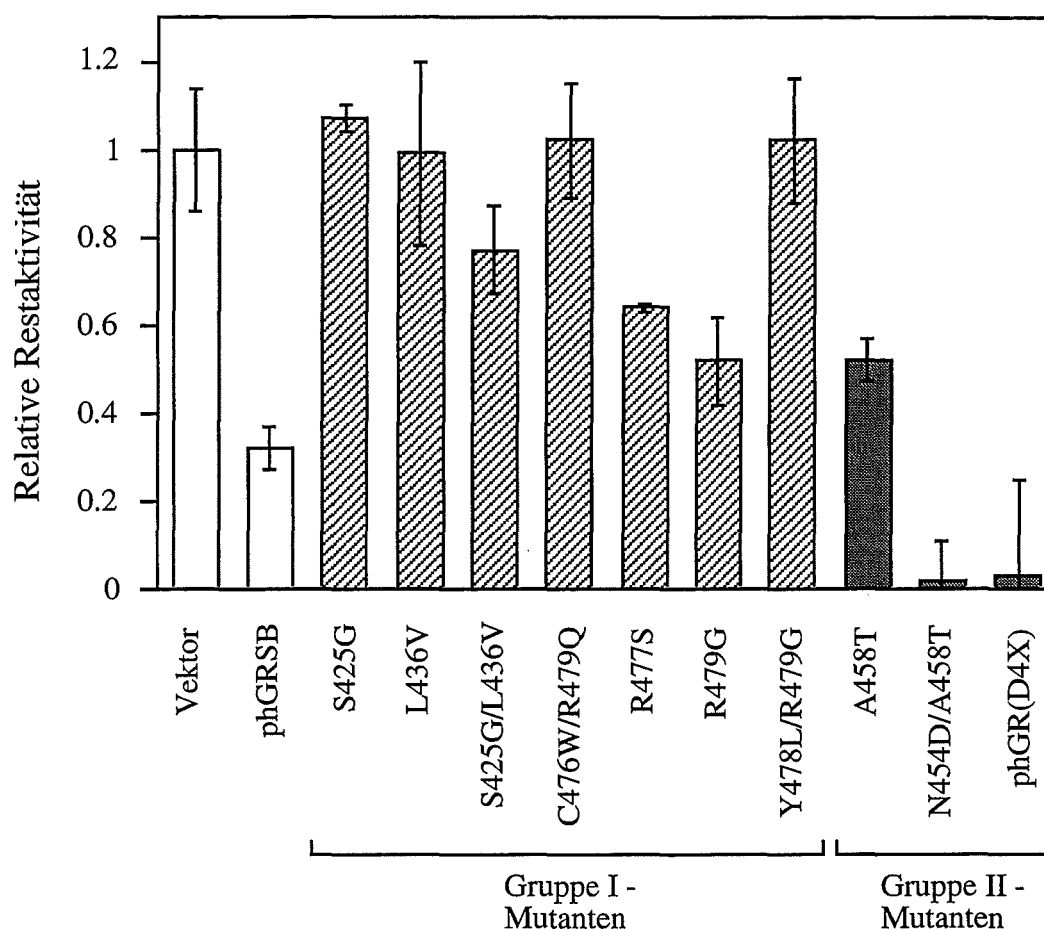


Abb. 6: Reprimierende Aktivität der GR-Mutanten an einem Reporter gen mit multimerisierter AP-1-Bindestelle. CV-1-Zellen wurden mit jeweils 5 µg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der Rezeptormutanten zusammen mit 5 µg des Reportergens 5x TRE TATA CAT kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit dem Phorbol ester TPA (80 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10⁻⁷ M) für 38 h behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität mit jeweils 60 µg Protein bestimmt. Die Restaktivität des Reportergens ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der gemessenen CAT-Aktivität in Anwesenheit von TPA und Hormon und der Aktivität ohne Hormon nur in Anwesenheit von TPA. Dieser Wert wurde im Falle des leeren Kontrollvektors dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Restaktivität in Anwesenheit des Wildtyp-GR bzw. der mutierten Rezeptoren wurde dann relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Für obige Untersuchungen zur Transrepression wurde das artifizielle Reporterplasmid 5x TRE TATA CAT mit einer multimerisierten AP-1-Bindestelle verwendet. Mit Hilfe dieses Konstruktes sollte ausschließlich die Interaktion zwischen GR und AP-1 betrachtet werden, ohne Beeinflussung durch andere Faktoren, die eventuell an ein natürliches Promotorkonstrukt zusätzlich binden würden. Um jedoch die Ergebnisse aus den obigen Mutationsanalysen in

einer möglichst natürlichen Situation zu bestätigen und somit ihre Relevanz zu untermauern, wurde die AP-1-reprimierende Eigenschaft des GR an einem weiteren AP-1-abhängigen Reporter gen getestet, welches der *in vivo* Situation eher entspricht. Hierzu wurde der Promotor des menschlichen Gens der Metalloproteinase Kollagenase I von Position -73 bis +63 vor dem *Firefly* Luciferase-Reporter gen verwendet. Kollagenase I ist ein Enzym, das am Gewebeabbau beispielsweise bei Entzündungsreaktionen beteiligt ist; seine AP-1-abhängige Expression wird durch Glucocorticoide reprimiert. Der Kollagenase I-Promotor enthält dieselbe funktionelle AP-1-Bindestelle, die im 5x TRE TATA CAT-Reporter multimerisiert ist. In transienten Transfektionsexperimenten, wiederum in GR-negativen CV-1-Zellen, wurde dann die Repression dieses AP-1-abhängigen Reporterplasmids durch die Gruppe I und II Mutanten durch Messung der Luciferase-Aktivität untersucht. Die AP-1-Aktivität wurde durch den Phorbol ester TPA induziert und die Rezeptorproteine mit Dexamethason aktiviert. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse dieser Transfektionen.

In diesen Transfektionsexperimenten konnten alle Mutanten der Gruppe I (mit Ausnahme von C476W/R479Q) die AP-1-Aktivität am Kollagenase I-Promotor reprimieren (Abb. 7). Dies widerspricht teilweise den Ergebnissen der Transfektionsexperimente aus Abb. 6. Dort waren einige mutierte Rezeptoren der Gruppe I nicht mehr in der Lage, die AP-1-Aktivität an dem artifiziellen Reporter 5x TRE TATA CAT zu reprimieren, obwohl sie noch transaktivieren konnten (vergleiche S425G, L436V und Y478L/R479G in Abb. 6 und Abb. 7). Offensichtlich verhalten sich diese mutierten Rezeptoren bezüglich der Transrepression verschieden gegenüber einer multimerisierten AP-1-Bindestelle und einer einfachen Bindestelle, wie sie im Kollagenase I-Promotor vorkommt. Grund hierfür ist möglicherweise ein Unterschied in der Zusammensetzung der Untereinheiten von AP-1, die im Vergleich zu einer einfachen Bindestelle im Kollagenase I-Promotor an eine künstlich multimerisierte AP-1-Bindestelle binden. Es wäre nicht ungewöhnlich und wurde bereits beschrieben, daß solche Unterschiede in der Besetzung von AP-1-Bindestellen existieren (Chiu et al., 1989).

Das Ergebnis mit der Mutante C476W/R479Q war in den in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellten Transfektionsexperimenten unverändert. Dieser transkriptionell nicht mehr aktive mutierte Rezeptor eignet sich als Negativkontrolle für weitere Experimente.

Anders als bei Gruppe I waren die Ergebnisse der Gruppe II-Mutanten konsistent bezüglich ihrer Fähigkeit zur Repression der AP-1-Aktivität am Kollagenase I-Promotor (Abb. 7) und an dem Reporter konstrukt mit multimerisierter AP-1-Bindestelle (Abb. 6). Zwar zeigen die Mutanten N454D/A458T und phGR(D4X) einen unterschiedlichen Grad der Repression an beiden Reporter genen, dennoch können alle drei Gruppe II-Mutanten die AP-1-Aktivität reprimieren. Ihre Fähigkeit zur Transrepression blieb somit erhalten, obwohl ihre Fähigkeit zur Dimerisierung und zur Transaktivierung beeinträchtigt ist (siehe 3.1.2).

Im Gegensatz zur Gruppe I eignen sich demnach die bei der Gruppe II eingeführten Mutationen tatsächlich zur Unterscheidung der transreprimierenden und transaktivierenden Eigenschaft des GR. Sie können daher als "dissoziierende" Mutanten bezeichnet werden. Für alle weiteren

Untersuchungen zur Analyse der transreprimierenden Aktivität des GR wurden deshalb nur noch die Mutanten der Gruppe II verwendet.

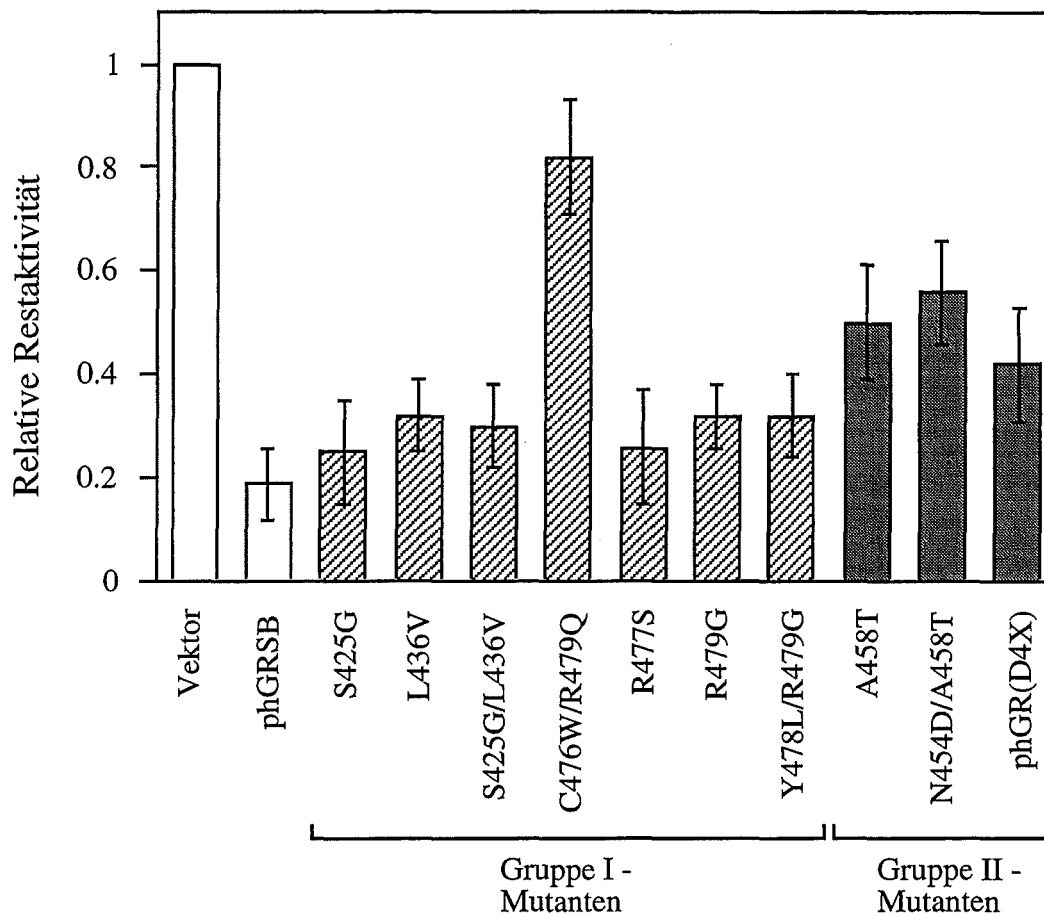


Abb. 7: AP-1-reprimierende Aktivität der GR-Mutanten am Kollagenase I-Promotor. CV-1-Zellen wurden mit jeweils 0,7 µg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der Rezeptormutanten zusammen mit 6 µg des Reportergens -73 +63 Coll. Luc kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit dem Phorbolster TPA (80 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10^{-7} M) für 38 h behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und mit jeweils gleicher Proteinmenge (200 µg) die Luciferase-Aktivität als relative Lichteinheiten bestimmt. Die Restaktivität des Luciferase-Reportergens ergab sich aus dem Verhältnis zwischen den relativen Lichteinheiten in Anwesenheit von TPA und Hormon und den relativen Lichteinheiten ohne Hormon nur in Anwesenheit von TPA. Dieses Verhältnis wurde im Falle des leeren Kontrollvektors dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Werte in Anwesenheit des Wildtyp-GR bzw. der mutierten Rezeptoren wurden relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Als wichtige Schlußfolgerung ergibt sich aus einem Vergleich der Transaktivierung (siehe 3.1.2) und der AP-1-Repression durch die Gruppe II-Mutanten, daß die Dimerisierung des GR sowie seine DNA-bindenden und transaktivierenden Eigenschaften für die Repression der AP-

1-Aktivität nicht notwendig sind. Transrepression durch den GR kann offensichtlich durch Rezeptor-Monomere erfolgen und unabhängig von einer Transaktivierung stattfinden.

Die bisher durchgeführten Mutationsanalysen des GR zur Untersuchung seiner transreprimierenden Eigenschaft bezogen sich nur auf die Repression des Transkriptionsfaktors AP-1 und eines seiner Zielgene. Andere Gene, die durch den GR reprimiert werden, werden jedoch von anderen Transkriptionsfaktoren positiv kontrolliert und besitzen dadurch einen anderen Promotorkontext als beispielsweise das Kollagenase I-Gen. Will man die genreprimierende Eigenschaft des GR näher charakterisieren, stellt sich daher die Frage, ob der GR die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren und deren Zielgene nach demselben Mechanismus reprimiert wie beispielsweise AP-1. Dieser Frage wurde im Folgenden nachgegangen.

3.1.4 Dissoziierende Mutanten des GR unterscheiden zwischen verschiedenen Mechanismen der Transrepression

Falls es ein einheitliches Modell für die Hemmung der Genexpression durch den GR gibt, sollte die reprimierende Wirkung des Rezeptors auf verschiedene Transkriptionsfaktoren und Zielgene nach den gleichen Bedingungen erfolgen, wie die Hemmung von AP-1 am Kollagenase I-Gen. Für jede Art von Repression sollten die gleichen Eigenschaften des GR verantwortlich sein. Dies beinhaltet beispielsweise, daß die dimerisierungsdefekten Mutanten der Gruppe II die Aktivität anderer Faktoren an anderen Zielgenen auf gleiche Art und Weise reprimieren sollten.

Um dies zu untersuchen, wurden drei verschiedene Promotorkonstrukte verwendet, die durch den GR transkriptionell reprimiert werden: (i) Ein Reporter-gen, das ein sogenanntes negatives GRE aus dem Rinder Prolaktin-Promotor vor dem Thymidin-Kinase (Tk)-Promotor und dem Luciferase-Gen enthält (pRLtkLuc). Das am negativen Rückkopplungsmechanismus von Glucocorticoiden beteiligte Prolaktin-Gen wurde aus mechanistischen Gesichtspunkten für die Analyse der Genrepression durch den GR herangezogen. In der Promotorregion dieses Gens sind regulatorische Elemente vorhanden, die in Anwesenheit von aktiviertem GR die Repression durch Glucocorticoide vermitteln (negative GREs (nGREs)). Dies erfolgt vermutlich durch Bindung des Rezeptors an diese Elemente und Verdrängung eines aktivierenden Faktors (siehe Kapitel 1). (ii) Ein Reporter-gen mit der 5' flankierenden Promotorregion des menschlichen Gens für das Interzelluläre-Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) ab Position -1393 vor dem Luciferase-Gen (pBH Luc 1.3). Das ICAM-1-Gen wurde für diese Untersuchung nicht nur aus mechanistischen Gründen ausgewählt, sondern weil es eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt, vor allem bei der Rekrutierung und Wanderung von Leukocyten zum Ort einer Entzündung. Das ICAM-1-Gen steht unter der positiven Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B, dessen Aktivität durch den GR am ICAM-1-Promotor gehemmt wird. (iii) Als Beispiel für ein weiteres Reporter-gen, das positiv

durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert und durch den GR reprimiert wird, wurde ein Konstrukt mit drei Kopien der NF- κ B-Bindestelle aus dem HIV1-*long terminal repeat* (LTR) vor dem Tk-Promotor und dem Luciferase-Gen (3Enh-tk Luc) verwendet. Dieses Promotorkonstrukt hat den Vorteil, daß man ausschließlich die Interferenz zwischen dem GR und NF- κ B betrachten kann. Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, besteht dabei allerdings die Gefahr, daß sich solch ein Promotorkonstrukt mit multimerisierter Bindestelle anders verhält, als ein Konstrukt mit einem natürlichen Promotorbereich.

In transienten Transfektionen wurde die Hemmung der drei beschriebenen Reporter-Genkonstrukte durch den Wildtyp-GR bzw. die Gruppe II-Mutanten in Anwesenheit von Dexamethason durch Messung der Luciferase-Aktivität analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich auch die Hemmung durch den mutierten Rezeptor C476W/R479Q getestet, welcher weder transaktivieren, noch die AP-1-Aktivität reprimieren kann. Im Falle des Prolaktin-nGRE enthaltenden Reportergens (pRLtkLuc) wurde die Repression der basalen Expression gemessen. Eine hohe Basalexpression des Reporters ist in rezeptornegativen Cos-7-Zellen (Affennierenzellen) gewährleistet, weshalb diese Zellen für die Transfektion verwendet wurden. Allerdings fehlt Cos-7-Zellen endogen die p65-Untereinheit von NF- κ B. Deshalb wurden für die Transfektionen mit den NF- κ B-abhängigen Reporter-Genen (pBH Luc 1.3 und 3Enh-tk Luc) rezeptornegative 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) benutzt. Die NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen wurde mit dem Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF α) induziert. In Abbildung 8 sind alle Ergebnisse der drei Transfektions-Analysen zusammen dargestellt.

Die Kotransfektion mit dem Wildtyp-GR (phGRSB) und dem Prolaktin-nGRE-Reporterplasmid resultierte, nach Induktion des Rezeptors mit Dexamethason, in einer deutlichen Hemmung der Reporter-Gen-Aktivität von mehr als 60% (Abb. 8A). Dagegen konnte keine der drei getesteten Gruppe II-Mutanten (A458T, N454D/A458T, phGR(D4X)) die Expression des Prolaktin-Reportergens reprimieren. Die mit diesen Mutanten gemessene relative Restaktivität bewegte sich im gleichen Bereich wie diejenige ohne Rezeptor (Vektor) bzw. diejenige mit der Negativkontrolle C476W/R479Q.

Die durch TNF α induzierte Expression des ICAM-1-Reporters konnte der hormoninduzierte Wildtyp-GR (phGRSB) um ca. 80% reprimieren (Abb. 8B), diejenige des NF- κ B-Reporterplasmids um etwa 50% (Abb. 8C). Im Gegensatz zur Negativkontrolle (C476W/R479Q), waren die drei getesteten GR-Mutanten (A458T, N454D/A458T, phGR(D4X)) in beiden Fällen in der Lage, die Expression dieser zwei NF- κ B-abhängigen Reporterplasmide zu hemmen. Im Falle des ICAM-1-Reporters etwas schwächer als der Wildtyp-GR (55-70%), im Falle des NF- κ B-Reporters genauso gut wie der Wildtyp-GR (ca. 50%). Das gleiche Verhalten der getesteten Rezeptoren an diesen beiden Reporterplasmiden zeigt, daß die mit dem Promotorkonstrukt 3Enh-tk Luc erzielten Ergebnisse auf das Verhalten an einem natürlichen NF- κ B-regulierten Promotor (wie im ICAM-1-Reporter) übertragen werden können. Somit kann dieses Reporter-Gen mit multimerisierten regulatorischen NF- κ B-Elementen weiterhin als Modell für die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den GR verwendet werden.

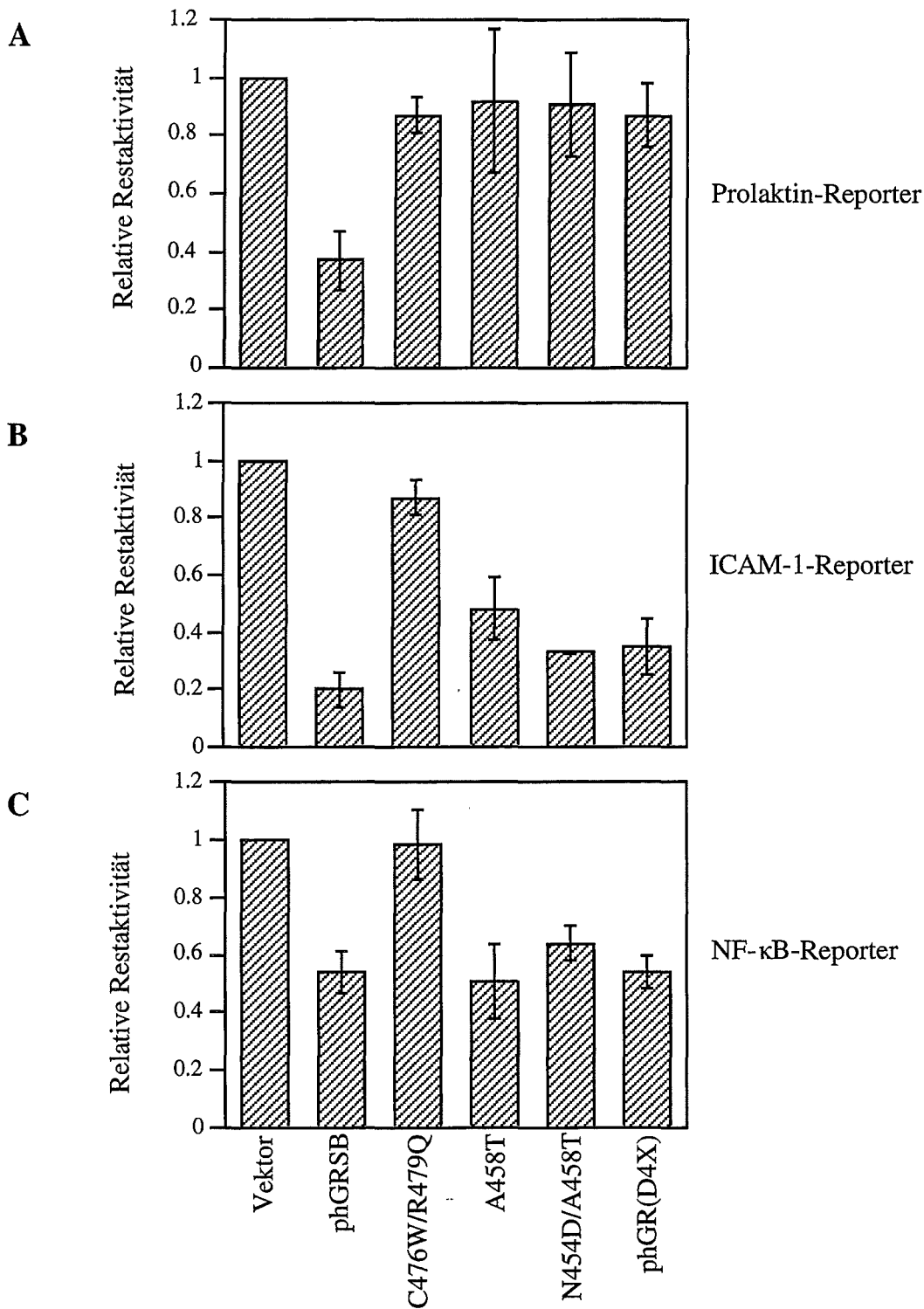


Abb. 8: Vergleich der transreprimierenden Eigenschaften der Rezeptor-Mutanten an verschiedenen Promotoren. (A) Cos-7-Zellen wurden mit jeweils 1 µg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGR.SB) oder der Rezeptormutanten zusammen mit 9 µg des Reportergens pRLtkLuc kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit Dexamethason (10⁻⁷ M) behandelt. Die weiteren Schritte erfolgten wie unten beschrieben. (B) 293-Zellen wurden mit jeweils 3

μg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der Rezeptor-Mutanten zusammen mit 5 μg des Reportergens pBH Luc 1.3 kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit TNF α (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Die weiteren Schritte erfolgten wie unten beschrieben. (C) 293-Zellen wurden mit jeweils 2 μg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der Rezeptor-Mutanten zusammen mit 0,5 μg des Reportergens 3Enh-tk Luc kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit TNF α (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Die weiteren Schritte erfolgten wie nachfolgend beschrieben.

Cos-7-Zellen wurden 38 h nach der Behandlung, 293-Zellen 24 h nach der Behandlung geerntet. Mit jeweils gleicher Proteinmenge (200 μg) wurde dann die Luciferase-Aktivität als relative Lichteinheiten bestimmt. Die Restaktivität des Luciferase-Reportergens ergab sich bei (A) aus dem Verhältnis zwischen der in Anwesenheit von Dexamethason und der ohne Hormon gemessenen Lichteinheiten. Bei (B) und (C) berechnete sich die Restaktivität des Reportergens aus dem Verhältnis zwischen den relativen Lichteinheiten in Anwesenheit von TNF α und Hormon und den relativen Lichteinheiten ohne Hormon nur in Anwesenheit von TNF α . Diese Verhältnisse wurden im Falle des leeren Kontrollvektors dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Werte in Anwesenheit des Wildtyp-GR bzw. der mutierten Rezeptoren wurden relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse dieser Transfektions-Analysen zusammen mit denjenigen aus den Untersuchungen zur Repression der AP-1-Aktivität (siehe 3.1.3) machen deutlich, daß offensichtlich zwei verschiedene Mechanismen existieren, nach denen der GR Zielgene reprimieren kann. Für die Repression von Genen, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind und durch AP-1 und NF- κ B positiv reguliert werden, benutzt der GR vermutlich einen einheitlichen Mechanismus (Typ A), für die Repression des Prolaktin-Gens offensichtlich einen anderen (Typ B). Dieser Repressionsmechanismus vom Typ B ist von den gleichen Eigenschaften des GR abhängig (Dimerisierung und DNA-Bindung), wie der Mechanismus der Transaktivierung an einem klassischen GRE. Dagegen kann der Repressionsmechanismus vom Typ A durch Mutationen in der Dimerisierungsdomäne des GR von dessen transaktivierender Funktion unterschieden werden. Diese Ergebnisse sind zur Übersicht nochmals in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Vergleich der Transaktivierung und Transrepression verschiedener Zielgene durch den GR bzw. Gruppe II-Mutanten des GR

	TRANSAKTIVIERUNG	TRANSREPRESSION		
		Typ A		Typ B
	MMTV (klassisches GRE)	Kollagenase I (AP-1)	ICAM-1 (NF-κB)	Prolaktin (negatives GRE)
GRwt	+	+	+	+
Rezeptor-Mutanten mit Defekt in der Dimerisierungsdomäne (Gruppe II)	-	+	+	-

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Fähigkeit einer dieser GR-Mutanten zur Dissoziation zwischen Transaktivierung und Transrepression (Typ A) dazu verwendet, den Mechanismus der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch den GR näher zu charakterisieren (Kapitel 3.3.1.2). Zuvor wurde jedoch in einem zweiten Ansatz untersucht, ob solch eine Unterscheidung auch durch Verwendung synthetischer Liganden des GR erreicht werden kann.

3.2 Trennung der positiven und negativen Genregulation durch den GR mit Hilfe von Liganden und Zuordnung einer dieser Eigenschaften zu deren anti-inflammatorischer Wirkung

Seit einiger Zeit wird vermehrt nach synthetischen Steroiden gesucht, die die Funktionen des GR so beeinflussen, daß sie zwar noch anti-inflammatorisch wirken, gleichzeitig jedoch verminderte Nebenwirkungen aufweisen. Möglicherweise reflektieren diese erwünschten und unerwünschten biologischen Eigenschaften von Glucocorticoiden ihre unterschiedlichen Effekte bei der Regulation der Expression bestimmter Gene. Unter diesem Aspekt wurden in dieser Arbeit verschiedene Steroid-Analoga daraufhin getestet, ob sie Transaktivierung und Transrepression durch den GR unterscheiden können und ob eine dieser Eigenschaften mit ihrer anti-inflammatorischen Aktivität korreliert.

3.2.1 Glucocorticoid-Antagonisten eignen sich nur begrenzt zur Dissoziation von Transaktivierung und Transrepression

Einige dieser synthetischen Steroid-Analoga hemmen die Wirkung der physiologischen Glucocorticoide, weshalb sie auch als Antagonisten bezeichnet werden. Solche synthetischen Liganden des GR, wie beispielsweise RU486 (Mifepriston) und ZK98299 (Onapriston) (Abb. 9), können alleine nicht, oder nur gering, die Transaktivierung durch den GR induzieren. (Für RU486 wurde in einigen Fällen eine geringe Fähigkeit zur Transaktivierung durch den GR beobachtet (Webster et al., 1988; Härtig et al., 1993; Wehle et al., 1995)).

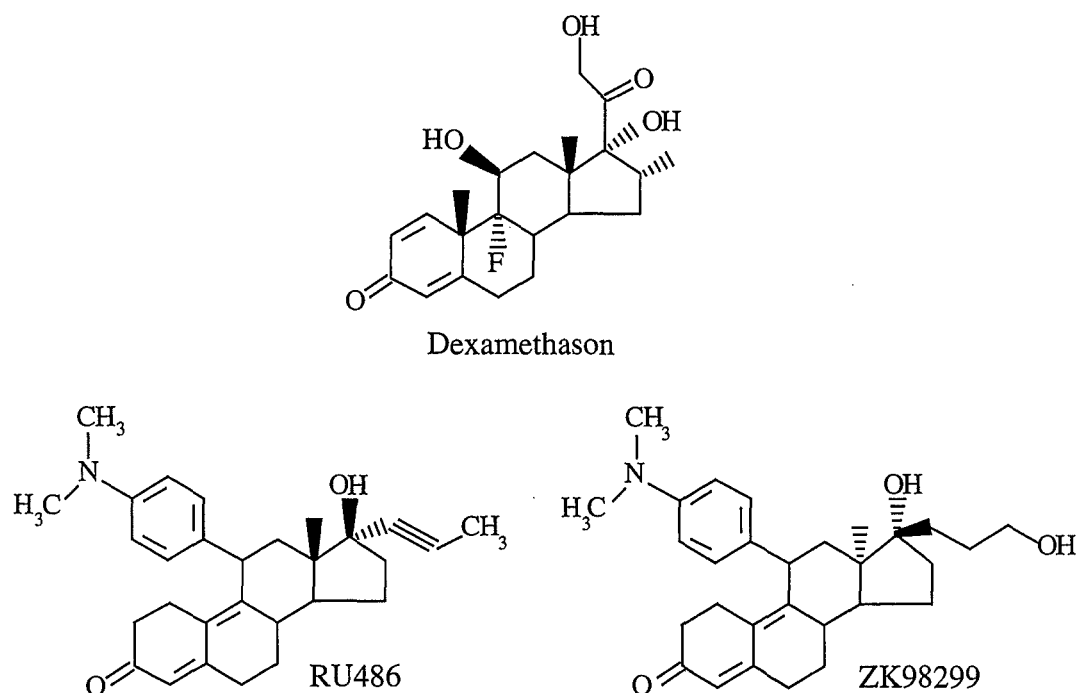


Abb. 9: Struktur verschiedener Steroid-Analoga. Dargestellt sind die Strukturen der beiden als Antagonisten klassifizierten Steroid-Analoga RU486 (Mifepriston) und ZK98299 (Onapriston). Zum Vergleich ist zusätzlich die Struktur des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason gezeigt. RU486 besitzt eine 3- bis 4-fach bessere Rezeptor-Bindungsaffinität als Dexamethason, ZK98299 eine 1,5-fach schlechtere (Heck et al., 1994). Weitere Informationen zu diesen beiden synthetischen Steroiden können Heck et al., 1994 und Wehle et al., 1995 entnommen werden.

Aufgrund ihres fehlenden Potentials zur Transaktivierung war es interessant zu überprüfen, ob diese Steroid-Analoga noch in der Lage sind, die Transrepression eines AP-1-regulierten Gens zu vermitteln. Hierzu wurde die Hemmung der Transkription des AP-1-abhängigen Kollagenase I-Gens durch den endogenen GR in menschlichen HeLa (Cervix-Karzinom)-Zellen durch RU486 und ZK98299 im Vergleich zu Dexamethason auf RNA-Ebene analysiert. AP-1 wurde durch den Phorbolster TPA aktiviert, und damit die Transkription des Kollagenase I-Gens induziert. In Abbildung 10 ist das Autoradiogramm dieses *Northern-Blot* sowie dessen densitometrische Auswertung dargestellt.

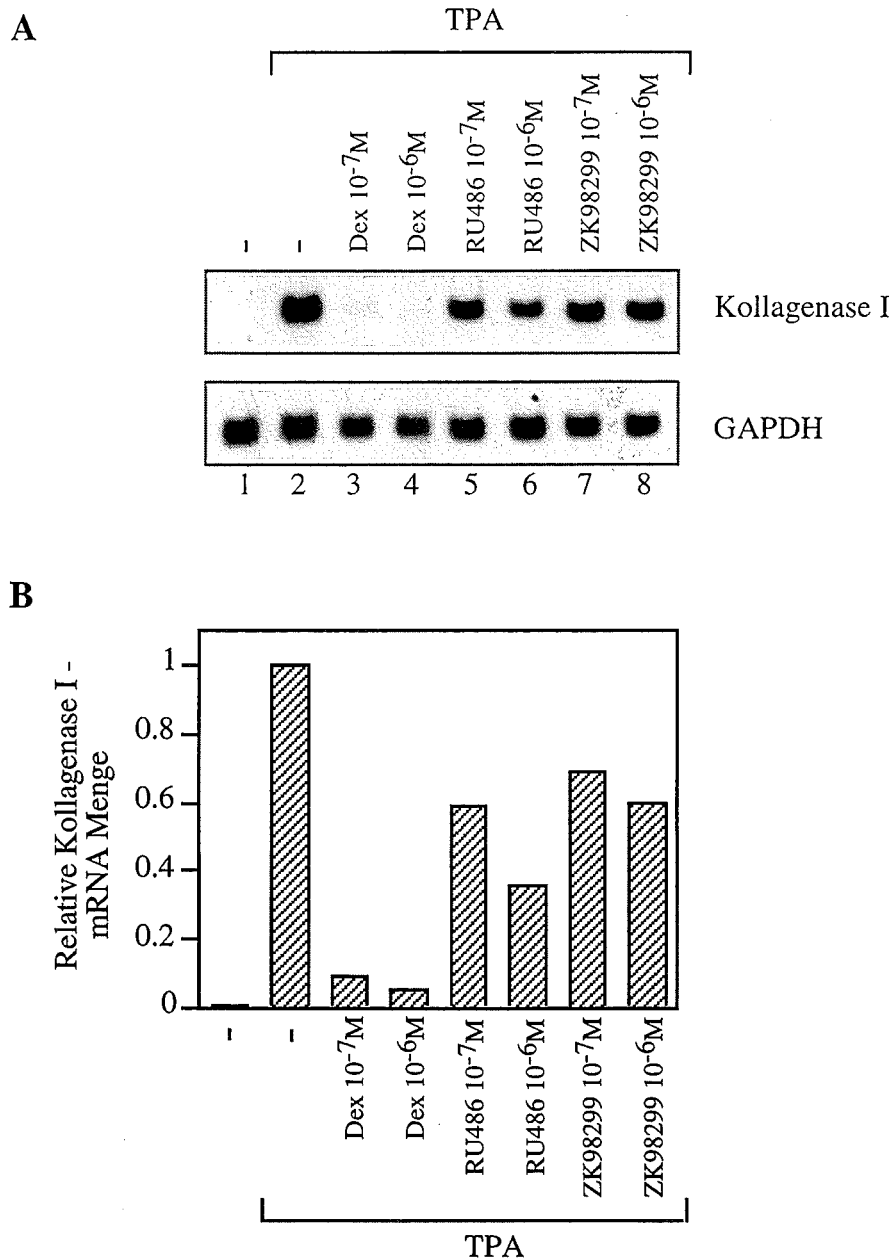


Abb. 10: Steroid-Antagonisten können nur schwach die Repression des Kollagenase I-Gens vermitteln. (A) Northern-Blot-Analyse mit RNA aus HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 4 Stunden mit Dexamethason, RU486 oder ZK98299 jeweils in einer Konzentration von $10^{-6} M$ und $10^{-7} M$ in Anwesenheit des Phorbolesters TPA (80 ng/ml) behandelt. Jeweils 5 μg poly(A)⁺ RNA aus diesen Zellen wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten hybridisiert, die für das menschliche Kollagenase I- bzw. GAPDH-Gen spezifisch sind. Die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde erfolgte zur Kontrolle der Menge der aufgetragenen RNA. In (B) wurde die Stärke der Northern-Blot-Signale mit Hilfe eines Phosphoimager (PhosphoImager, Fujix BAS 1000) densitometrisch ausgewertet und in einem Säulendiagramm dargestellt. Dabei wurden die Signale der Kollagenase I-Hybridisierung

auf die GAPDH-Signale normalisiert. Die Induktion der mRNA durch TPA wurde dem Wert 1 gleichgesetzt, diejenige in Anwesenheit von TPA und des jeweiligen Hormons wurde entsprechend zu diesem Wert ausgedrückt.

Die beiden Steroid-Analoga RU486 und ZK98299 konnten zu einem gewissen Grad die TPA-induzierte Expression des Kollagenase I-Gens reprimieren, im Vergleich zu Dexamethason war diese Repression jedoch nur gering (Abb. 10, vergleiche Spur 2 mit 3, bzw. mit 5 und 7). Erst in einer höheren Konzentration (10^{-6} M) führte RU486 zu einer Repression der Kollagenase I-Expression von etwa 60%, ZK98299 nur zu einer Repression von 40% (Abb. 10, Spur 6 und 8). RU486 und ZK98299 vermitteln zwar keine Transaktivierung von endogenen Genen mehr (Wehle et al., 1995), ihre relativ schwache transreprimierende Aktivität macht sie jedoch ungeeignet dazu, beide Eigenschaften des GR zu unterscheiden. Gleichzeitig zeigen diese beiden synthetischen Steroide im Tierversuch auch keine anti-inflammatorische Wirkung (A.C.B. Cato und H. Zentel, nicht publizierte Daten). Falls anti-inflammatorische Aktivität mit der negativen genregulatorischen Funktion des GR korreliert, sollten Steroid-Analoga, die eine stärkere Transrepression vermitteln können, auch wirkungsvollere anti-inflammatorische Substanzen sein.

3.2.2 Bestimmte Glucocorticoid-Analoga können zwischen Transaktivierung und Transrepression unterscheiden

In diesem Zusammenhang wurde in jüngster Zeit von der *Schering AG*, Berlin, eine andere Klasse synthetischer Steroid-Analoga entwickelt, die dem physiologischen Glucocorticoid Cortisol (Abb. 11) sehr ähnlich sind. Ob diese Steroide in der Lage sind, Transaktivierung und Transrepression von Genen durch den GR, ebenso wie anti-inflammatorische Effekte zu vermitteln, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. In Abbildung 11 sind vier dieser Steroid-Analoga dargestellt, deren Eigenschaften hier näher beschrieben werden sollen.

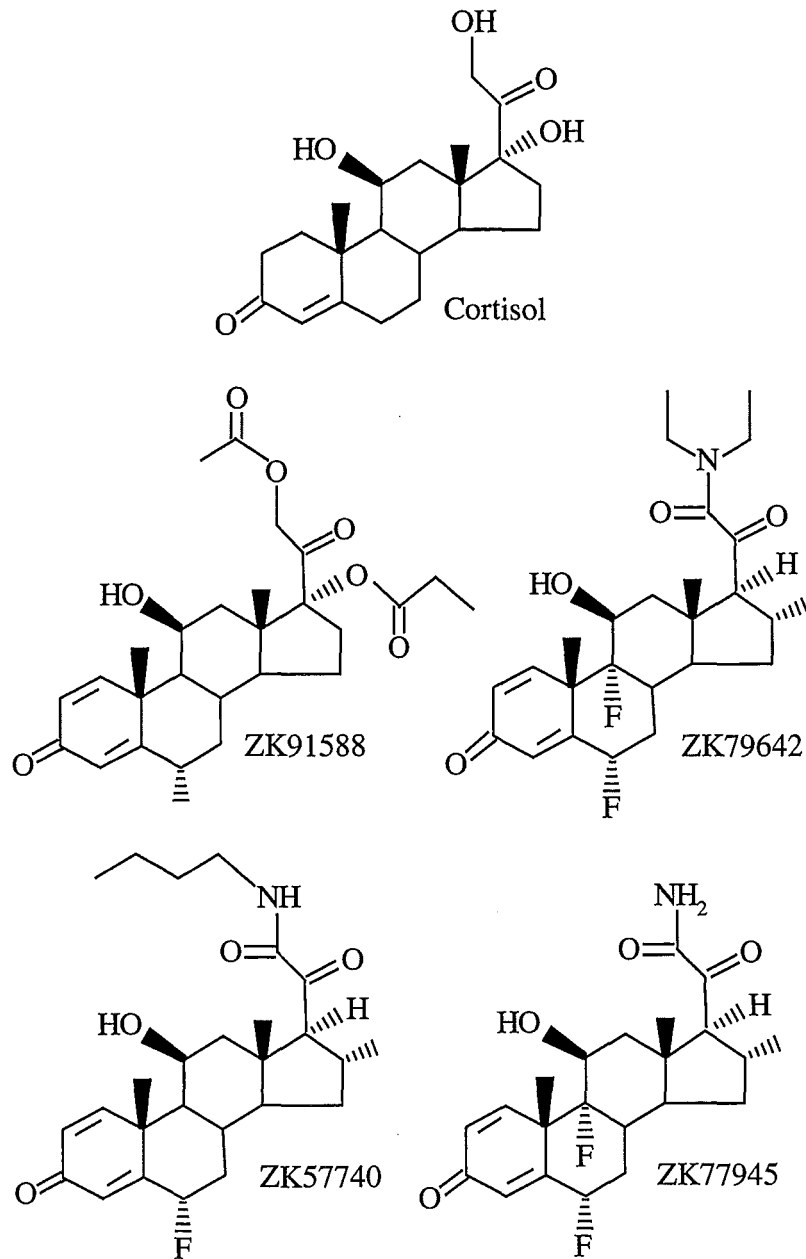


Abb. 11: Struktur verschiedener Steroid-Analoga. Dargestellt sind die Strukturen der Steroid-Analoga ZK91588 (Methylprednisolon-Aceponat), ZK57740, ZK77945 und ZK79642. Ihre relative Bindungsaffinität an den GR ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Informationen über ZK91588 kann Zentel und Töppert, 1994, entnommen werden. Zum Vergleich ist ebenfalls die Struktur des physiologischen Glucocorticoids Cortisol gezeigt.

Die Bestimmung der transaktivierenden und transreprimierenden Eigenschaften dieser Substanzen wurde mit Hilfe von *Northern-Blot*-Analysen an verschiedenen Zielgenen des GR durchgeführt. Zur Feststellung ihres transaktivierenden Potentials wurde die hormoninduzierte Transkription des Tyrosin-Aminotransferase (TAT)-Gens in FT0 (Ratten-Hepatom)-Zellen (Jantzen et al., 1987), sowie die des Metallothionein IIa (MT IIa)-Gens in menschlichen HeLa

(Cervix-Karzinom)-Zellen (Jantzen et al., 1987) analysiert. Zur Bestimmung der Transrepression wurde die Hemmung sowohl der TPA-induzierten Kollagenase I-Transkription in HeLa-Zellen (Jonat et al., 1990), als auch diejenige der durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierten Interleukin-1 β (IL-1 β)-Transkription in menschlichen THP-1-Zellen (Monocyten) (Lee et al., 1988) untersucht. Beide Gene werden negativ durch den GR reguliert (Jonat et al., 1990; Shirakawa et al., 1993; Tsukada et al., 1994). Die durchgeführten *Northern-Blot*-Analysen sind in Abb. 12 gezeigt. Eine quantitative Auswertung der *Northern-Blot*-Signale ist u.a. in Tabelle 3 zusammenfassend aufgelistet.

In den Experimenten zur Transaktivierung induzierten ZK91588 und ZK77945 die Transkription des TAT-Gens sogar effizienter als Dexamethason, ZK57740 ähnlich wie Dexamethason und ZK79642 etwas schwächer als Dexamethason (Abb. 12A). Ebenso konnten ZK91588, ZK57740 und ZK77945 die Transaktivierung des MT IIA-Gens signifikant induzieren, wenn auch teilweise etwas schwächer als Dexamethason. ZK79642 war dazu nicht mehr in der Lage (Abb. 12B). Die Steroid-Analoga ZK91588, ZK57740 und ZK77945 können demnach die Transaktivierung von Genen durch den GR vermitteln.

Bei der Untersuchung der Transrepression waren jedoch ZK57740 und vor allem ZK77945 in ihrer Fähigkeit, die Kollagenase I- und IL-1 β -Expression zu hemmen, stark beeinträchtigt; ZK79642 konnte gar keine Repression vermitteln. ZK91588 wirkte dagegen sogar stärker reprimierend als Dexamethason (Abb. 12C und D).

Diese Experimente zur Transrepression, zusammen mit den Untersuchungen zur Transaktivierung, identifizierten ZK57740 und ZK77945 als Steroid-Analoga mit trennenden Eigenschaften. Sie unterscheiden, zumindest teilweise, zwischen der transaktivierenden und transreprimierenden Wirkung des endogenen GR. Man kann sie deshalb als "dissoziierende" Steroid-Analoga bezeichnen. Die Ergebnisse sind noch einmal zusammenfassend in Tabelle 3 dargestellt. Aus dieser Tabelle ist auch ersichtlich, daß ZK57740 nur eine geringfügig schwächere, ZK77945 sogar eine 2-fach bessere Rezeptor-Bindungsaffinität als Dexamethason besitzt (H. Zentel, *Schering AG*, Berlin; nicht publizierte Daten). Ihr Verhalten kann also nicht durch eine veränderte Bindungsaffinität an den GR erklärt werden.

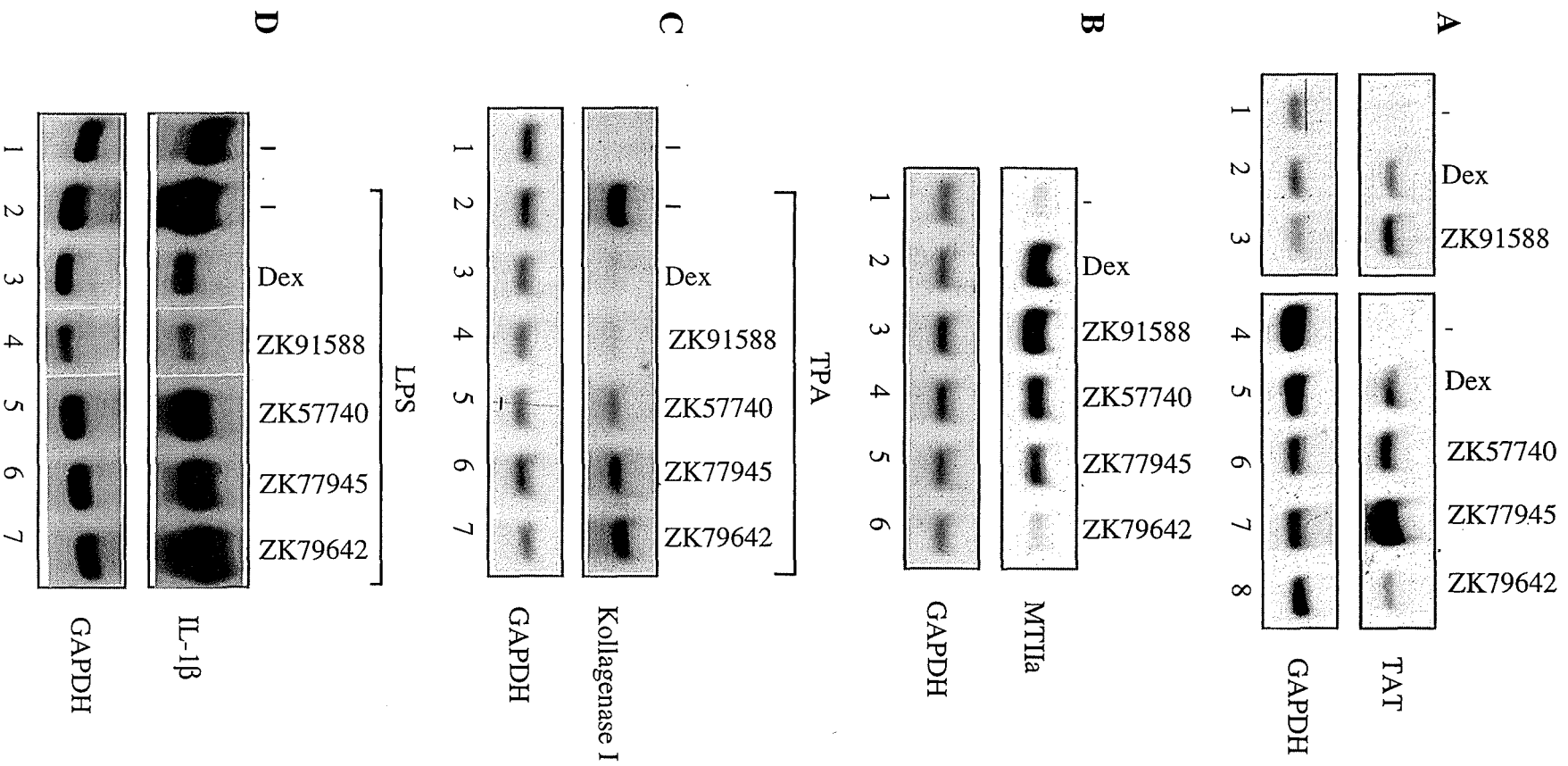


Abb. 12: Bestimmte Steroid-Analoga können zwischen transaktivierenden und transreprimierenden Eigenschaften des GR unterscheiden. *Northern-Blot*-Analysen mit RNA aus verschiedenen Zelllinien. Die RNA wurde auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen DNA-Fragmenten hybridisiert. (A) *Northern-Blot*-Analyse mit je 5 µg poly(A)⁺ RNA aus FT0-Zellen, die für 4 Stunden mit 10⁻⁷ M Dexamethason, ZK91588, ZK57740, ZK77945 oder ZK79642 behandelt wurden. Der *Northern-Blot* wurde mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des Tyrosin-Aminotransferase (TAT)-Gens der Ratte und des GAPDH-Gens hybridisiert. (B) *Northern-Blot*-Analyse mit je 5 µg poly(A)⁺ RNA aus HeLa-Zellen, die für 4 Stunden mit je 10⁻⁷ M der angegebenen Steroide behandelt wurden. Der *Northern-Blot* wurde mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des menschlichen Metallothionein IIa- bzw. GAPDH-Gens hybridisiert. (C) *Northern-Blot*-Analyse mit je 5 µg poly(A)⁺ RNA aus HeLa-Zellen, die für 4 Stunden mit je 10⁻⁷ M der angegebenen Steroide in Anwesenheit des Phorbolesters TPA (80 ng/ml) behandelt wurden. Der *Northern-Blot* wurde mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des menschlichen Kollagenase I- bzw. GAPDH-Gens hybridisiert. (D) *Northern-Blot*-Analyse mit je 5 µg poly(A)⁺ RNA aus THP-1-Zellen, die für 5 Stunden mit je 10⁻⁷ M der angegebenen Steroide in Anwesenheit von 10 µg/ml LPS behandelt wurden. Der *Northern-Blot* wurde mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des menschlichen IL-1β- bzw. GAPDH-Gens hybridisiert. (Die Hybridisierungen mit der GAPDH-Sonde erfolgten zur Kontrolle der Menge der aufgetragenen RNA.)

Um das anti-inflammatorische Potential der verschiedenen Steroid-Analoga zu bestimmen, wurden die Substanzen im Tiermodell von der *Schering AG*, Berlin, analysiert. Hierbei wurde ihre lokale anti-inflammatorische Aktivität mit Hilfe des klassischen Crotonöl-induzierten Ödem-Tests untersucht (Tonelli et al., 1965). Bei diesem Test wird die Fähigkeit einer Substanz getestet, eine durch Crotonöl am Ohr der Ratte örtlich induzierte Entzündung zu verhindern, wenn sie zusammen mit dem Crotonöl lokal aufgetragen wird. Die anti-inflammatorische Aktivität von ZK91588 (Methylprednisolon-Aceponat) wurde bereits in Zentel und Töpert, 1994, beschrieben. Die Ergebnisse dieses Tests sind für ZK91588 (Methylprednisolon-Aceponat), ZK57740, ZK77945 und ZK79642 im Vergleich zu Dexamethason in Tabelle 3 zusammengefaßt. Während ZK91588 (Methylprednisolon-Aceponat) die gleiche anti-inflammatorische Aktivität wie Dexamethason aufwies, waren ZK57740, ZK77945 und ZK79642 in diesem *in vivo*-Test völlig inaktiv (Tab. 3). Wie hier gezeigt (Abb. 12), können die beiden nicht mehr anti-inflammatorisch wirkenden Steroid-Analoga ZK57740 und ZK77945 zwar noch die GR-abhängige Transaktivierung, nicht aber die Repression von Genen vermitteln.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, daß die genreprimierende Eigenschaft des GR der entscheidende Parameter bei der Vermittlung anti-inflammatorischer Effekte ist. Anti-inflammatorische Aktivität korreliert mit der transkriptionellen Repression von Genen durch den GR.

Tab. 3: Vergleich der genregulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften verschiedener Steroid-Analoga. Die relative Bindungsaffinität der Steroid-Analoga an den GR sowie ihre anti-inflammatorische Aktivität wurden von der *Schering AG*, Berlin, bestimmt. Zur Feststellung der Bindungsaffinität wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz bestimmt, die benötigt wird, um die Bindung von [³H]Dexamethason an den GR aus Rattenleber-Cytosol-Extrakt zu 50% zu kompetieren. Die Bindungsaffinität von Dexamethason wurde dem Wert 100 gleichgesetzt, diejenige der Steroid-Analoga relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Die Bestimmung der lokalen anti-inflammatorischen Aktivität erfolgte nach dem Crotonöl induzierten Ödem-Test am Ohr der Ratte (Tonelli et al., 1965). Die Stärke der anti-inflammatorischen Wirkung der Steroid-Analoga wurde entsprechend zu derjenigen von Dexamethason ausgedrückt. Die transaktivierenden und transreprimierenden Eigenschaften der Steroid-Analoga an endogenen Genen ergaben sich aus *Northern-Blot*-Analysen wie in Abb. 12 dargestellt. Die jeweiligen *Northern-Blot*-Signale wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* (PhosphoImager, Fujix BAS 1000) densitometrisch ausgewertet und auf die GAPDH-Signale normalisiert. Die durch Dexamethason erreichte Aktivierung bzw. Repression der Transkription wurde dem Wert 1 gleichgesetzt, diejenige in Anwesenheit des jeweiligen Steroid-Analogs entsprechend zu diesem Wert ausgedrückt.

Substanz	Relative Bindungsaffinität	Aktivierung des TAT-Gens	Aktivierung des MT IIa-Gens	Repression des Kollagenase I Gens	Repression des IL-1 β -Gens	Lokale anti-inflammatorische Aktivität
Dexamethason	100	1.0	1.0	1.0	1.0	+++
ZK91588	48	1.9	0.8	1.0	1.3	+++
ZK57740	71	1.7	0.6	0.4	0.0	-
ZK77945	200	6.1	0.7	0.3	0.1	-
ZK79642	36	1.5	0.4	0.2	0.0	-

Die bisher in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, daß man durch die Einführung von Mutationen in den GR sowie durch die Wahl bestimmter Liganden die transkriptionelle Aktivierung und Repression von Genen durch den GR trennen kann. Desweiteren kann angenommen werden, daß die transreprimierende Eigenschaft des GR eine wichtige Rolle bei der Vermittlung anti-inflammatorischer Effekte spielt. Im dritten Teil der Arbeit wurden nun diese Informationen dazu verwendet, den Mechanismus der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den GR genauer zu untersuchen.

3.3 Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den GR

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen, da er die Expression vieler immunregulatorischer Gene positiv reguliert. Glucocorticoide hingegen hemmen die Synthese der meisten an inflammatorischen Prozessen beteiligten Cytokine und Zell-Adhäsionsmoleküle (zur Übersicht siehe Barnes und Adcock, 1993; Cato und Wade, 1996). Man nimmt daher an, daß die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den GR den Hauptanteil zur anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden beiträgt. Der Mechanismus, der dieser Interferenz zwischen dem GR und NF- κ B zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht geklärt und wurde erst in jüngster Zeit im Einzelnen analysiert.

Aufgrund verschiedener Daten wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen, die die Repression der NF- κ B-Aktivität durch den GR erklären könnten: *In vitro* Kopräzipitations-Experimente haben gezeigt, daß der GR direkt mit NF- κ B-Untereinheiten interagieren kann und so möglicherweise die DNA-Bindung und das Transaktivierungspotential von NF- κ B zerstört (Ray und Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinmann et al., 1995b). Dexamethason kann jedoch auch die Synthese des Inhibitorproteins von NF- κ B, I κ B α , induzieren, was dazu führen könnte, daß NF- κ B inaktiv im Cytoplasma zurückgehalten wird (Auphan et al., 1995; Scheinmann et al., 1995a). Erwies sich das letztere Modell als richtig, so würde das bedeuten, daß die genaktivierende Eigenschaft des GR indirekt einen reprimierenden Effekt auf NF- κ B ausübt. Dies würde wiederum die zuvor gemachte Vermutung (Kapitel 3.2.2) entkräften, daß die transreprimierende, nicht jedoch die transaktivierende Eigenschaft des GR für seine anti-inflammatorischen Effekte notwendig ist. Um herauszufinden, ob die GR-induzierte Synthese von I κ B α oder eine Protein-Protein-Interaktion zwischen GR und NF- κ B für die Repression der NF- κ B-Aktivität verantwortlich ist, wurden im Folgenden beide Mechanismen genauer betrachtet.

3.3.1 Synthese des Inhibitorproteins I κ B α durch den GR

Zur Untersuchung der Glucocorticoid-vermittelten Synthese von I κ B α wurde zunächst deren Zustandekommen geklärt. Im Anschluß daran wurde der Frage nachgegangen, ob diese Synthese von I κ B α erforderlich ist, um eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Glucocorticoide zu erreichen.

3.3.1.1 Die Transkription des I κ B α -Gens wird durch Dexamethason induziert

Grundlage für eine hormoninduzierte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α kann die Induktion der Transkription des I κ B α -Gens durch Glucocorticoide sein. Auf mRNA-Ebene wurde deshalb zunächst überprüft, ob Dexamethason in der Lage ist, die I κ B α -mRNA-Expression zu erhöhen. Hierzu wurde eine *Northern-Blot*-Analyse mit mRNA aus einem HeLa-Zellklon durchgeführt, der stabil mit dem Reportergen -121+5 HIV-CAT transfiziert ist. Dieses Konstrukt enthält vor dem CAT-Gen die zwei NF- κ B-Bindestellen aus dem HIV1-LTR und ist deshalb für seine Expression von aktivem NF- κ B abhängig. Da die basale Aktivität dieses Reportergens in diesem HeLa-Klon relativ hoch ist, kann mit seiner Hilfe gleichzeitig zur I κ B α -mRNA-Expression auch die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Hormon über die CAT-Expression gemessen werden.

Nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason ist nach 4 Stunden ein deutlicher Rückgang der CAT-Expression zu beobachten (Abb. 13A, Spur 3 und 4), der auf eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch das Hormon zurückzuführen ist. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression der I κ B α -mRNA durch Dexamethason, was die Ursache für eine Repression der NF- κ B-Aktivität durch den GR sein könnte. Dieser Anstieg der I κ B α -mRNA-Menge nach 4 Stunden ist nicht auf eine Stabilisierung der I κ B α -mRNA durch Dexamethason zurückzuführen (Heck et al., 1997). Es lag daher die Vermutung nahe, daß Glucocorticoide direkt die Transkription des I κ B α -Gens bewirken.

Deshalb wurde im nächsten Schritt überprüft, ob der Promotor des I κ B α -Gens die nötigen Elemente für eine hormonelle Regulation besitzt. Dazu wurde ein Luciferase-Reporterplasmid, welches I κ B α -Promotor-Sequenzen enthält (von Position -623 bis +11), transient in HeLa-Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden dann mit Dexamethason oder, als Positivkontrolle, mit TPA behandelt, welches die NF- κ B-Aktivität induziert. Dexamethason verstärkte die Reportergen-Aktivität etwa um das 2-fache (Abb. 13B), möglicherweise durch ein GRE im I κ B α -Promotor, da ein Luciferase-Reporterkonstrukt ohne Promotorsequenzen nicht auf Dexamethason reagierte. TPA induzierte ebenfalls die Aktivität des I κ B α -Reporterplasmids (Abb. 13B), wahrscheinlich durch die NF- κ B-Bindestellen im I κ B α -Promotor (Ito et al., 1994). Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Dexamethason und TPA zusammen hatte einen mehr als additiven Effekt (Abb. 13B), was die Interpretation zuläßt, daß diese beiden Induktoren durch ihre jeweiligen *response* Elemente im I κ B α -Promotor miteinander kooperieren.

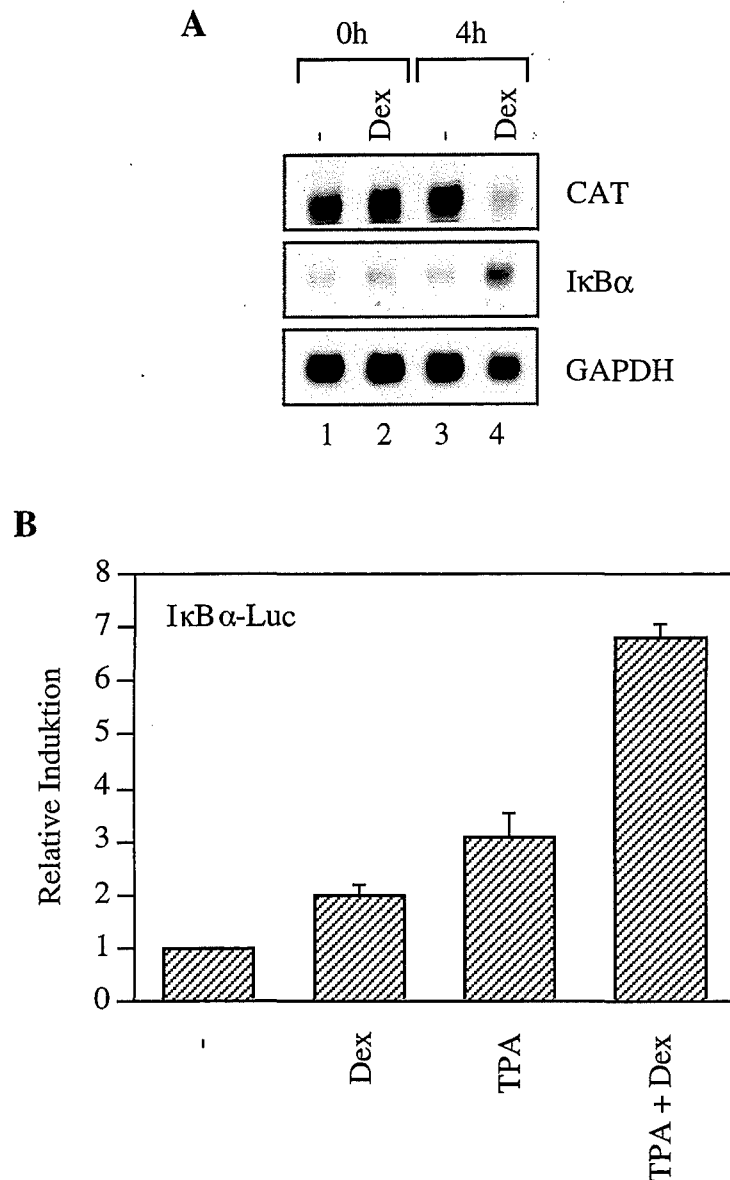


Abb. 13: Die Hormon-induzierte Synthese von IκBα erfolgt auf der Ebene des IκBα-Promotors. (A) HeLa-Zellen, die stabil mit dem NF-κB-abhängigen Reporter-gen -121+5 HIV-CAT transfiziert sind, wurden nicht bzw. für 4 Stunden mit Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Jeweils 5 µg poly(A)⁺ RNA aus diesen Zellen wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetragen, auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gens (CAT), des menschlichen IκBα-Gens sowie des GAPDH-Gens hybridisiert. Die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde erfolgte zur Kontrolle der Menge der aufgetragenen RNA. (B) Transiente Transfektion mit einem IκBα-Promotor-Reporter-gen. HeLa-Zellen wurden transient mit 5 µg des IκBα-Luciferase Reporterkonstruktes pGL2 MAD3-Luc transfiziert und für 24 h unbehandelt gelassen bzw. mit Dexamethason (10^{-7} M), TPA (80 ng/ml) oder TPA und Dexamethason behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und Zellextrakte mit gleicher Proteinmenge für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse als Grad der Induktion des Reporter-gens relativ zu dem Wert 1, welcher nominell der Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von

Hormon zugeordnet wurde. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Glucocorticoid-vermittelte Synthese von I κ B α aus einer transkriptionellen Aktivierung des Gens resultiert, das für dieses Protein kodiert. Ob diese verstärkte Expression von I κ B α eine Voraussetzung für die hormoninduzierte Repression NF- κ B-regulierter Gene ist, wurde nachfolgend untersucht.

3.3.1.2 Eine Mutante des GR reprimiert die NF- κ B-Aktivität, obwohl sie I κ B α nicht mehr synthetisieren kann

Um festzustellen, inwieweit die GR-induzierte Synthese von I κ B α an der Repression der NF- κ B-Aktivität beteiligt ist, wurde der Versuch unternommen, die NF- κ B-Repression von der hormoninduzierten I κ B α -Synthese zu trennen. Hierzu wurde die in Kapitel 3.1 charakterisierte GR-Mutante GR(D4X) (Abb. 4) verwendet, die zwischen Transaktivierung und Transrepression NF- κ B-regulierter Genen dissoziieren kann. Zusätzlich wurde noch eine weitere Mutante benutzt, LS-7, die die Punktmutationen P493R und A494S im Ratten-GR trägt, entsprechend den Positionen 474 und 475 im menschlichen GR (zur Lokalisation der Mutationen siehe Abb. 4). Für die LS-7-Mutante war schon seit längerem beschrieben, daß sie zur Transrepression von Genen noch in der Lage ist, jedoch nicht mehr zur Transaktivierung (Skena et al., 1989; Helmberg et al., 1995).

Für die nachfolgenden Experimente wurden Klone der Ω E Fibroblasten-Zelllinie verwendet, die stabil mit Expressionsvektoren der mutierten Rezeptoren (rGR(LS-7) und hGR(D4X)), ihrer entsprechenden Wildtyp-GRs (rGR und hGR), bzw. einem leeren Expressionsvektor (Vektor) transfiziert waren. Die parentale Ω E Zelllinie besitzt keinen endogenen GR.

In transienten Transfektionsexperimenten mit diesen Ω E-Klonen wurde die Fähigkeit der stabil transfizierten GR-Mutanten überprüft, in Anwesenheit von Dexamethason die Aktivität eines GR-abhängigen MMTV-Reporterplasmids (pHC_{wt}-Luc) zu induzieren bzw. diejenige eines NF- κ B-abhängigen Reporterplasmids (3Enh-tk Luc) zu reprimieren. Die NF- κ B-Aktivität wurde durch TNF α induziert. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse dieser Transfektionen.

In den Transaktivierungs-Experimenten zeigten die LS-7-transfizierten Zellen eine stark verminderte, jedoch noch meßbare Fähigkeit, die Expression des MMTV-Reportergens zu induzieren (Abb. 14A). Folglich ist die LS-7-Mutante nicht vollständig transaktivierungsdefekt. Zellen, die die dimerisierungsdefekte Mutante GR(D4X) exprimieren, zeigten dagegen einen kaum signifikanten Effekt auf die Reportergen-Expression, wenn man sie mit der Aktivität des Leervektor-Klons vergleicht (Abb. 14A).

In den Transrepressions-Experimenten inhibierten jedoch beide GR-Mutanten die Aktivität von NF- κ B an dem NF- κ B-abhängigen Reportergen in etwa genauso stark, wie ihre jeweiligen Wildtyp-Rezeptoren (Abb. 14B).

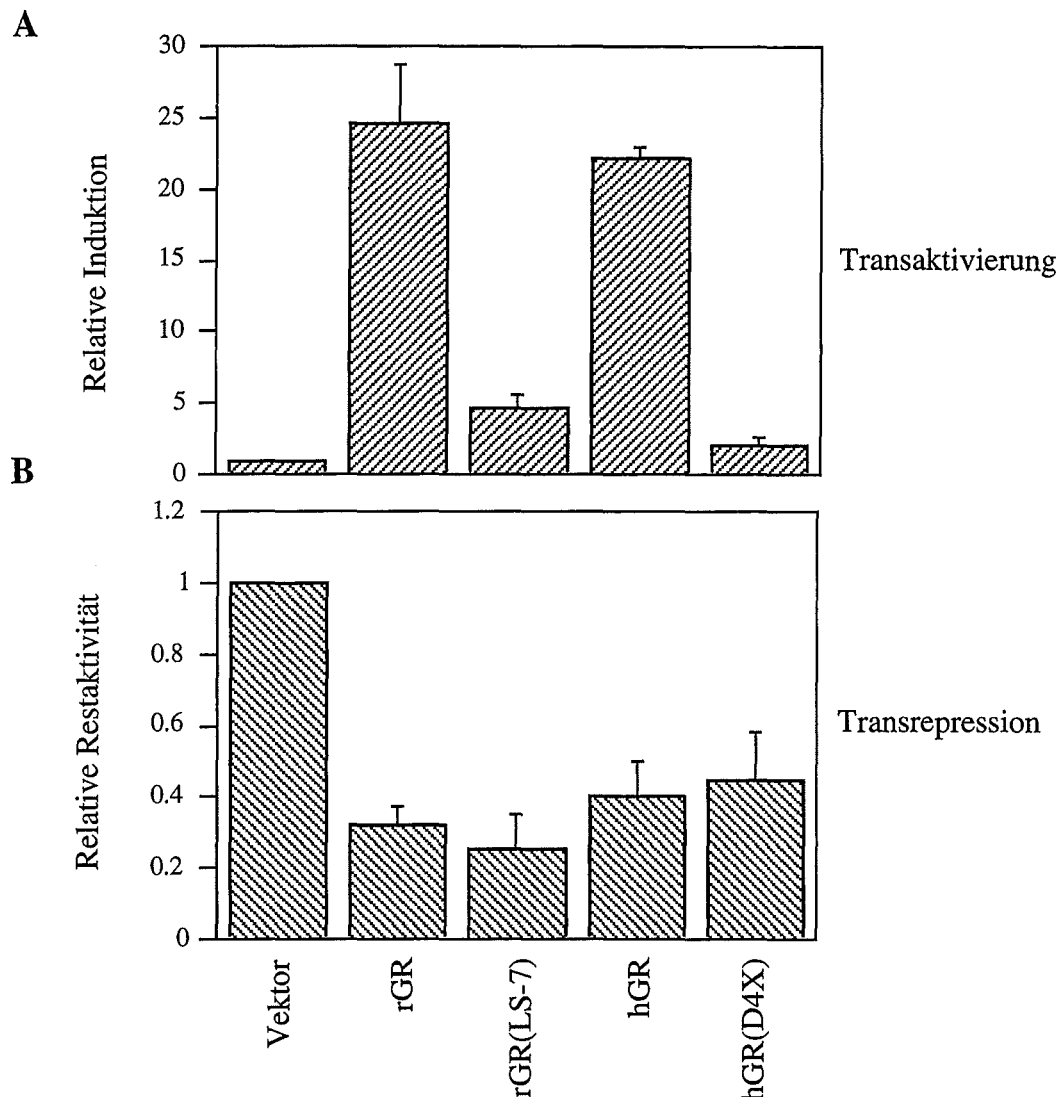


Abb. 14: Eine transaktivierungsdefekte Mutante des GR reprimiert die Aktivität von NF- κ B. (A) Transaktivierende Eigenschaften der Wildtyp-GR bzw. GR-Mutanten exprimierenden Ω E-Klone. Ω E-Zellen des jeweiligen Klons wurden mit je 9 μ g des MMTV-Reportergens pHCwt-Luc transient transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit Dexamethason (10^{-7} M) für 30 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität mit jeweils gleichen Proteinmengen bestimmt. Die Induktion ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der in Anwesenheit von Dexamethason und der ohne Hormon gemessenen Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Ergebnisse als Grad der Induktion der Reportergen-Expression relativ zu dem Wert 1, was dem Wert im Falle des Leervektor-Klons entspricht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Transreprimierende Eigenschaften der Wildtyp-GR bzw. GR-Mutanten exprimierenden Ω E-Klone. Ω E-Zellen des jeweiligen Klons wurden mit je 5 μ g des Reportergens 3Enh-tk Luc transient transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit TNF α (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10^{-7} M) für 30 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und mit jeweils gleicher Proteinmenge die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Restaktivität des Luciferase-Reportergens ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von TNF α und Hormon und derjenigen ohne Hormon nur in Anwesenheit von TNF α . Diese Restaktivität wurde im Falle des Leervektor-Klons dem Wert 1 gleichgesetzt,

Ergebnisse

diejenige der Rezeptor-Klone wurden relativ zu diesem Wert ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Falls die Hemmung von NF- κ B durch eine GR-vermittelte Synthese von I κ B α verursacht wird, so sollten beide mutierten Rezeptoren, die die NF- κ B-Aktivität reprimieren, auch das Inhibitorprotein I κ B α synthetisieren. Um dies festzustellen, wurden *Western-Blot*-Analysen mit Extrakten derselben Ω E-Klone durchgeführt, um unter Einfluß von Hormon die Menge an I κ B α -Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für I κ B α zu messen (Abb. 15). Gleichzeitig wurde mit einem Antikörper gegen den GR kontrolliert, ob die stabil transfizierten Klone vergleichbare Mengen an Rezeptorprotein exprimieren. Die Zellen wurden für diese *Western-Blot*-Analyse wie angegeben entweder unbehandelt gelassen, für 2,5 Stunden mit Dexamethason, bzw. 0,5 Stunden mit TNF α einzeln oder in Kombination behandelt. Diese Behandlung erfolgte aufgrund der von Auphan et al., 1995, zuvor beschriebenen Experimente. Eine Behandlung mit TNF α verstärkt den Effekt des Hormons, da es transient die basale, aber auch die induzierte I κ B α -Proteinmenge reduziert.

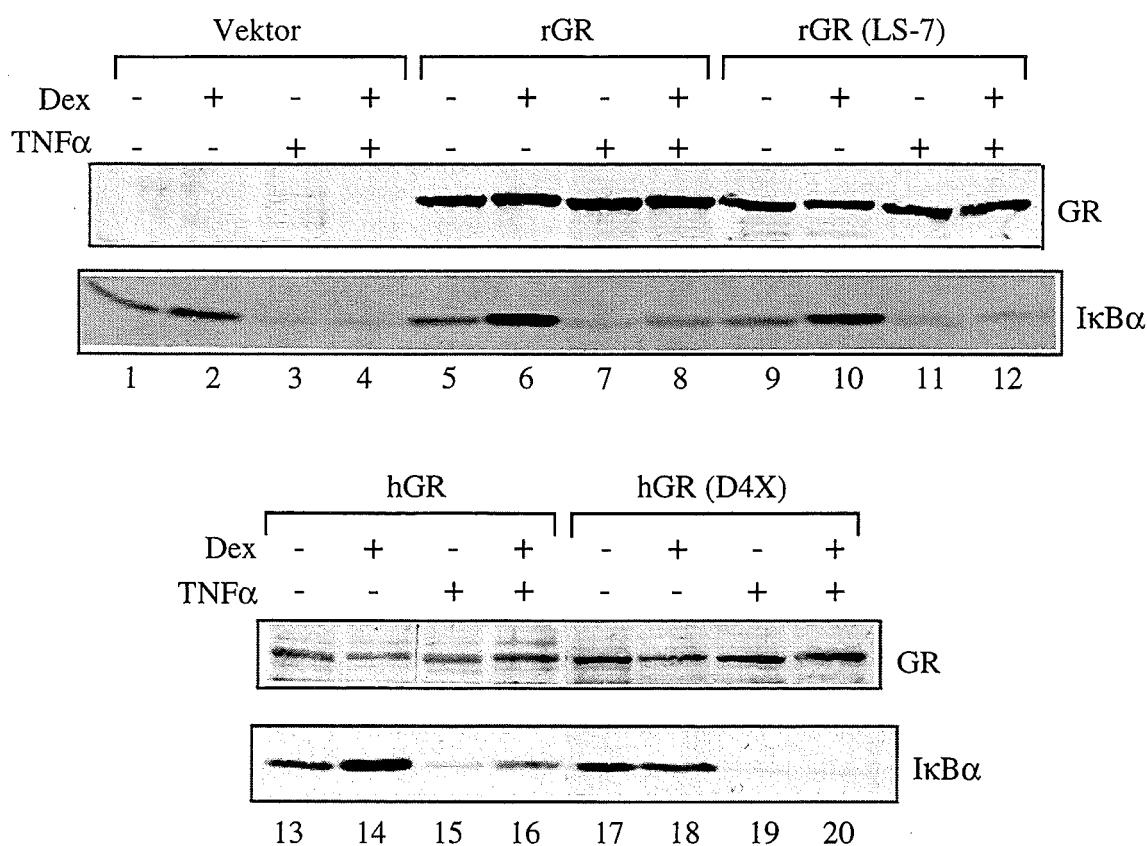


Abb. 15: Eine transaktivierungsdefekte GR-Mutante induziert auch nicht mehr die I κ B α -Synthese. *Western-Blot*-Analyse mit Proteinextrakten aus den angegebenen Ω E-Zellklonen. Die Zellen des jeweiligen Ω E-Klons wurden wie angegeben entweder unbehandelt gelassen, für 2,5 h mit Dexamethason (10^{-7} M) bzw. 0,5 h mit TNF α (5 ng/ml) behandelt oder 2 h mit Dexamethason vorbehandelt und für die letzten 0,5 h der Hormonbehandlung TNF α zugegeben. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgebrochen und Extrakte

mit der gleichen Menge an Protein in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach transferieren auf eine Membran wurden das I κ B α - und das GR-Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Der anti-I κ B α -Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000, der anti-GR-Antikörper von 1:100 verwendet.

In den Zell-Klonen, die stabil mit dem Ratten GR (rGR) bzw. dem menschlichen GR (hGR) transfiziert sind, verstärkte Dexamethason die I κ B α -Synthese um etwa das 2- bis 3-fache (Abb. 15, vergleiche Spur 5 mit 6 und Spur 13 mit 14). Dieser Anstieg der I κ B α -Proteinmenge war selbst in Anwesenheit von TNF α sichtbar (Abb. 15, vergleiche Spur 7 mit 8 und 15 mit 16). Zellen, die die LS-7-Mutante enthalten, zeigten eine reduzierte, aber sichtbare Aktivierung der I κ B α -Synthese nach Glucocorticoid-Behandlung. (Dies stimmt überein mit der zuvor beschriebenen schwachen Transaktivierung eines GR-abhängigen Reportergens durch diese Mutante.) Diese schwache Aktivierung konnte jedoch in Anwesenheit von TNF α nicht mehr beobachtet werden (Abb. 15, Spuren 9-12).

Zellen mit der Mutante GR(D4X), sowie Zellen mit dem leeren Expressionsvektor (Vektor) zeigten dagegen keinerlei hormonvermittelten Anstieg der I κ B α -Synthese, ungeachtet der Behandlung mit TNF α (Abb. 15, Spuren 1-4 und Spuren 17-20). Die Tatsache, daß die Mutante GR(D4X) jedoch die NF- κ B-Aktivität noch reprimiert (Abb. 14B), ist ein starkes Indiz dafür, daß diese Repression auch ohne induzierte I κ B α -Synthese erfolgen kann.

Die Daten in Abb. 14B spiegeln eine transkriptionelle Aktivität über einen Zeitraum von 30 Stunden wieder, während die *Western-Blot*-Analyse (Abb. 15) nur zu einem fixierten Zeitpunkt (2,5 Stunden) Informationen über die I κ B α -Menge gibt. Während dieser 30 Stunden könnte auch in den Zellen mit der GR(D4X)-Mutante I κ B α verspätet induziert werden und der Grund für die NF- κ B-Repression in diesen Zellen sein. Um dies zu überprüfen, wurden Experimente mit diesen OE-Klonen durchgeführt, um die Kinetik der Synthese des I κ B α -Proteins über den gesamten 30 Stundenzeitraum (wie in den Transrepressions-Experimenten) zu verfolgen. Repräsentative Ergebnisse dieser *Western-Blot*-Analysen sind in Abbildung 16 dargestellt.

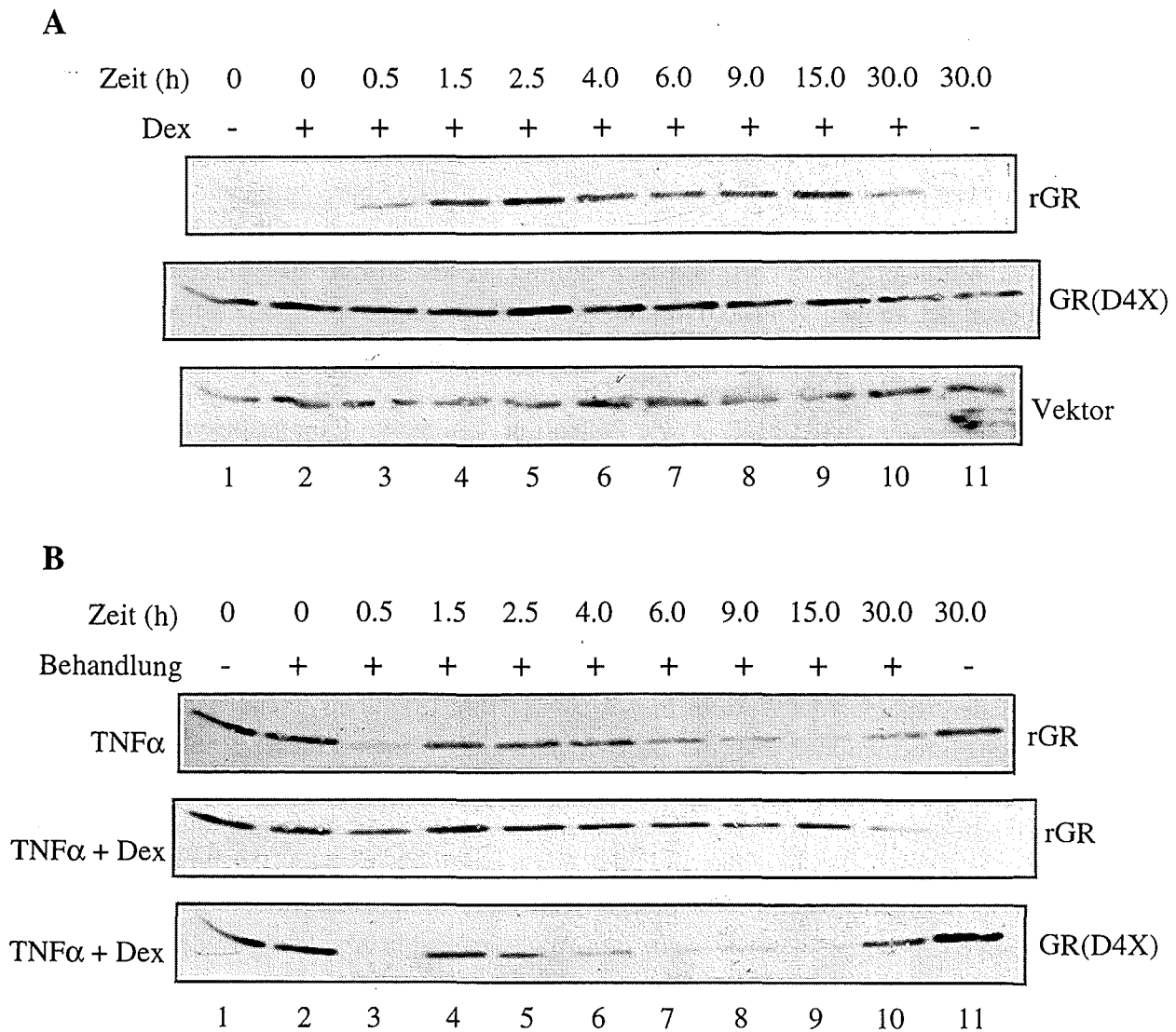


Abb. 16: In Kinetik-Experimenten unter reprimierenden Bedingungen ist im Gesamten kein Anstieg der $I\kappa B\alpha$ -Synthese zu beobachten. (A) und (B) *Western-Blot*-Analysen mit Proteinextrakten aus den angegebenen stabil transfizierten ΩE -Zellklonen mit einem Antikörper gegen $I\kappa B\alpha$. Die Zellen des jeweiligen ΩE -Klons wurden wie angegeben entweder unbehandelt gelassen, mit Dexamethason (10^{-7} M) oder $TNF\alpha$ (5 ng/ml) bzw. mit Dexamethason und $TNF\alpha$ für die angegebenen Zeiten behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit der gleichen Menge an Protein in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach transferieren auf eine Membran wurde das $I\kappa B\alpha$ -Protein mit Hilfe eines anti- $I\kappa B\alpha$ -Antikörpers (1:1000) nachgewiesen.

Die Experimente zur Kinetik der $I\kappa B\alpha$ -Synthese zeigten, daß der Glucocorticoid-vermittelte Anstieg über einen längeren Zeitraum anhält. In Zellen, die den Wildtyp-GR enthalten, induzierte Dexamethason die $I\kappa B\alpha$ -Synthese bis zu 15 Stunden (Abb. 16A, rGR, Spuren 1-9).

Dann nimmt dieser Effekt allmählich ab, ist jedoch nach 30 Stunden Behandlung immer noch sichtbar (Abb. 16A, rGR, vergleiche Spur 10 mit 11). (Eine ähnliche Kinetik wurde mit Zellen erhalten, die die Mutante LS-7 exprimieren, obwohl in diesem Falle die Dexamethason-induzierte Synthese von I κ B α reduziert war.) Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit dem mutierten Rezeptor GR(D4X) bzw. dem leeren Expressionsvektor keinen hormonvermittelten Anstieg der I κ B α -Synthese über den gleichen Zeitraum (Abb. 16A, GR(D4X) und Vektor, Spuren 1-11).

Da die Ω E-Zellen in den Transrepressions-Experimenten (Abb. 14B) gleichzeitig mit Dexamethason und TNF α behandelt wurden, wurde im nächsten Schritt untersucht, welchen Effekt diese Bedingungen auf die I κ B α -Synthese haben. In dem Wildtyp-GR exprimierenden Klon führte TNF α alleine zunächst zu einer raschen Abnahme der I κ B α -Menge nach 0,5 Stunden, da es die Degradation des Proteins bewirkt. Nach 1,5 bis 4 Stunden steigt die I κ B α -Menge wieder, gefolgt von einer zweiten Phase in der I κ B α abnimmt (6-15 Stunden), bevor wieder die basale I κ B α -Proteinmenge erreicht wird (Abb. 16B, TNF α , rGR, Spuren 1-11). Es gibt zur Zeit noch keine Erklärung für diese zweite Phase der I κ B α -Verminderung. Gleichzeitige Behandlung der Zellen, die den Wildtyp-GR exprimieren, mit Dexamethason und TNF α führten im Gesamten zu keiner drastischen Veränderung der I κ B α -Proteinmenge (Abb. 16B, TNF α +Dex, rGR, Spuren 1-11). (Die verminderte I κ B α -Menge in Spur 11 dieses Experiments ist auf eine Störung im *Western-Blot*-Verfahren zurückzuführen.) Dasselbe Ergebnis wurde mit Extrakten aus dem Zellklon erhalten, der stabil mit dem mutierten Rezeptor LS-7 transfiziert ist. In den Zellen, die die Mutante GR(D4X) exprimieren, unterschied sich die I κ B α -Kinetik nach gleichzeitiger Behandlung mit Dexamethason und TNF α nicht von der Kinetik mit TNF α alleine (Abb. 16B, TNF α +Dex, GR(D4X), Spuren 1-11).

Diese Experimente zeigen, daß es durch Dexamethason in Anwesenheit von TNF α keinen Nettoanstieg der I κ B α -Synthese über einen Zeitraum von 30 Stunden gibt. Dennoch reprimieren sowohl der rGR als auch die Mutante GR(D4X) die NF- κ B-Aktivität. Dies läßt den Schluß zu, daß eine erhöhte I κ B α -Proteinmenge für eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den GR nicht notwendig ist.

3.3.1.3 Dissoziierende Steroid-Analoga können die NF- κ B-Aktivität nicht mehr reprimieren, obwohl sie die I κ B α -Synthese noch vermitteln

In einem zweiten Versuch, die hormoninduzierte I κ B α -Synthese von der NF- κ B-Repression zu trennen, wurde eine umgekehrte Situation etabliert, bei der die Glucocorticoid-induzierte I κ B α -Synthese stattfindet, ohne daß eine Repression NF- κ B-regulierter Gene die Folge ist. Dies wurde durch die Verwendung der in Kapitel 3.2.2 charakterisierten dissoziierenden Steroid-Analoga erreicht, die auch keine anti-inflammatorische Aktivität mehr aufweisen. Wie bereits beschrieben, können die beiden Steroid-Analoga ZK57740 und ZK77945 zwar noch die Transaktivierung durch den GR vermitteln, sind jedoch in ihrer Fähigkeit, Zielgene des GR zu

reprimieren, stark beeinträchtigt. Darum wurde in einer *Western-Blot*-Analyse und in transienten Transfektionen überprüft, ob diese synthetischen Steroide in derselben Ω E-Zelllinie die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteinsynthese und die Aktivität eines MMTV-Reporterplasmids ($\text{pHC}_{\text{wt}}\text{-Luc}$) induzieren, sowie diejenige eines NF- κ B-abhängigen Reporterplasmids (3Enh-tk Luc) reprimieren können. Diese Untersuchungen wurden zusammen mit den ebenfalls zuvor charakterisierten synthetischen Steroid-Analoga RU486 (Kapitel 3.2.1) und ZK79642 (Kapitel 3.2.2) als Negativkontrollen, sowie Dexamethason und ZK91588 (Kapitel 3.2.2) als Positivkontrolle mit dem Ω E-Zellklon durchgeführt, der stabil den Ratten Wildtyp-GR exprimiert. In Abbildung 17 sind diese Experimente zusammengefaßt.

Die *Western-Blot*-Analyse zeigt, daß die beiden dissoziierenden Liganden ZK57740 und ZK77945, ebenso wie ZK91588 und Dexamethason nach 2,5 Stunden die Synthese von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ induzieren können (Abb. 17A). Die Steroid-Analoga RU486 und ZK79642 veränderten hingegen die Menge an synthetisiertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nicht (Abb. 17A).

Dieses Muster spiegelte sich auch in den Transaktivierungs-Experimenten in transienten Transfektionen wieder. Diejenigen Liganden, welche die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese induzierten, vermittelten auch eine Aktivierung des MMTV-Reportergens in denselben Ω E-Zellen (Abb. 17B).

In den Transrepressions-Experimenten konnten jedoch nur Dexamethason und ZK91588 durch den GR die NF- κ B-Aktivität hemmen (Abb. 17C). Die dissoziierenden Liganden ZK57740 und ZK77945, die die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese induzierten, vermittelten dagegen keine signifikante Hemmung der NF- κ B-Aktivität (Abb. 17C). RU486 und ZK79642 konnten die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese nicht induzieren, waren zugleich aber auch nicht in der Lage, eine Repression der NF- κ B-Aktivität zu vermitteln (Abb. 17C).

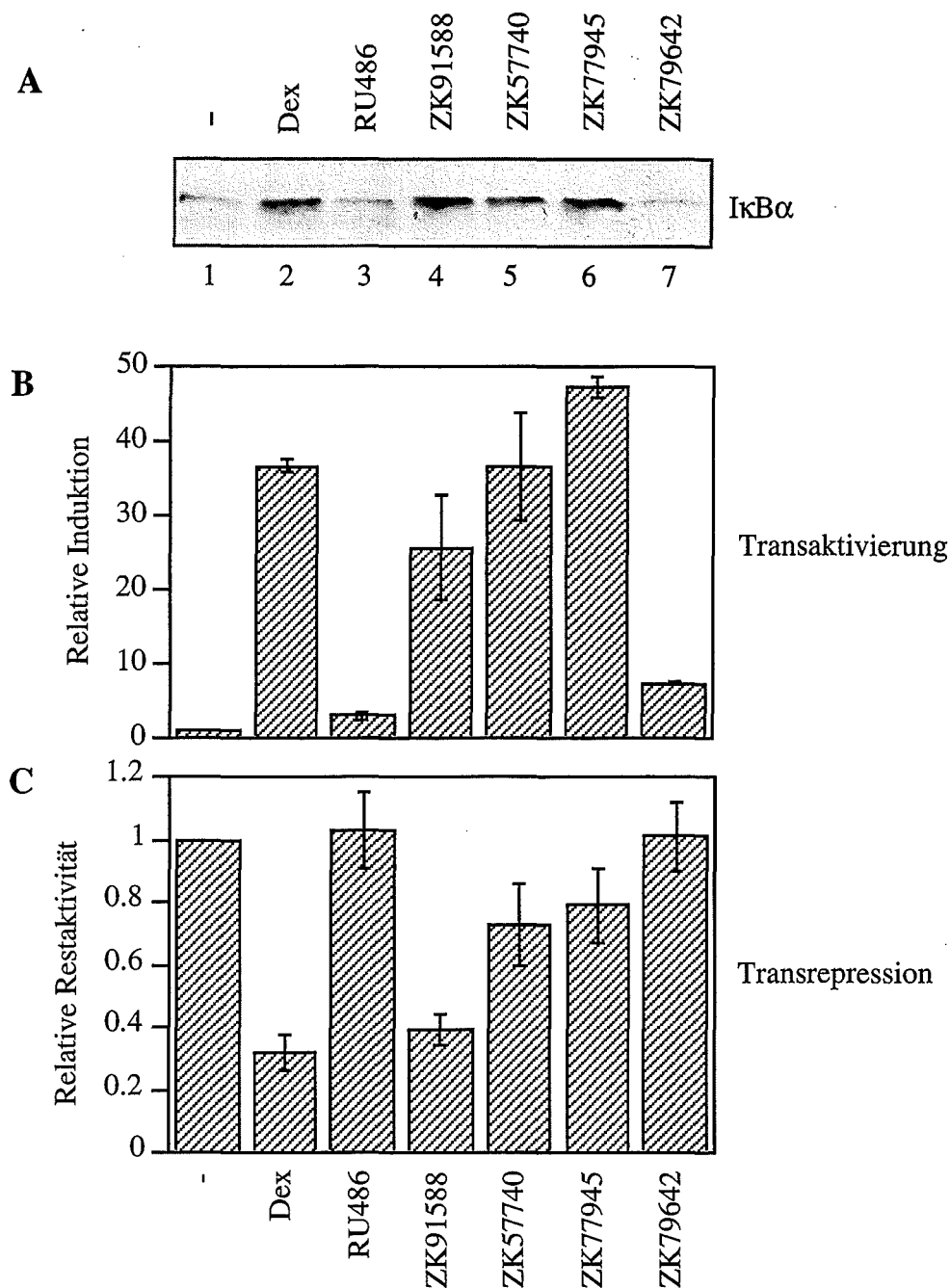


Abb. 17: Dissoziierende Steroid-Analoga induzieren die IκBα-Synthese, hemmen jedoch nicht die Aktivität von NF-κB. (A) *Western-Blot*-Analyse mit einem Antikörper gegen IκBα mit Proteinextrakten aus ΩE-Zellen, die stabil mit dem Wildtyp Ratten-GR transfiziert sind. Die Zellen wurden wie angegeben entweder unbehandelt gelassen oder mit je 10^{-7} M Dexamethason, RU486, ZK91588, ZK57740, ZK77945 oder ZK79642 für 2,5 h behandelt. In der letzten halben Stunde dieser Behandlung wurde TNFα zu einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugegeben. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit der gleichen Menge an Protein in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach transferieren auf eine Membran wurde das IκBα-Protein mit Hilfe eines anti-IκBα-Antikörpers (1:1000) nachgewiesen. (B) Transaktivierende Eigenschaften der angegebenen Steroid-Analoga in ΩE-Zellen, die stabil mit dem Wildtyp Ratten-GR transfiziert sind. Die Zellen wurden mit je 9 μg des MMTV-Reportergens pHCwt-Luc transient

transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit je 10^{-7} M der angegebenen Glucocorticoid-Analoga für 30 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität mit jeweils gleichen Proteinnengen bestimmt. Die Induktion ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der in Anwesenheit von Hormon und der ohne Hormon gemessenen Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Ergebnisse als Grad der Induktion der Reporter-Expression relativ zu dem Wert 1, was der Induktion in Abwesenheit von Hormon entspricht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. (C) Transreprimierende Eigenschaften der angegebenen Steroid-Analoga in Ω E-Zellen, die stabil mit dem Wildtyp Ratten-GR transfiziert sind. Die Zellen wurden mit je 5 μ g des Reportergens 3Enh-tk Luc transient transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit $\text{TNF}\alpha$ (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von je 10^{-7} M der angegebenen Glucocorticoid-Analoga für 30 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und mit jeweils gleicher Proteinmenge die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Restaktivität des Luciferase-Reportergens ergab sich aus dem Verhältnis zwischen der Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ und Hormon und derjenigen ohne Hormon nur in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$. Diese Restaktivität wurde relativ zu dem Wert 1 ausgedrückt, welcher nominell der Restaktivität in Abwesenheit von Hormon zugeordnet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

Aus diesen Experimenten konnten zwei wichtige Schlußfolgerungen abgeleitet werden:

- (i) Die Tatsache, daß ZK57740 und ZK77945 die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese vermitteln konnten, die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität jedoch nicht signifikant reprimierten, zeigt deutlich, daß eine hormoninduzierte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese nicht ausreichend ist, um eine Hemmung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität zu erreichen.
- (ii) Die Fähigkeit, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -regulierte Gene zu reprimieren, scheint jedoch für eine anti-inflammatorische Wirkung erforderlich zu sein, da von den getesteten Steroiden nur diejenigen, die die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität reprimierten (Dexamethason und ZK91588, Abb. 17B), auch anti-inflammatorisches Potential besitzen (Tab. 3).

Zusammengefaßt lassen die in Kapitel 3.3.1.2 dargestellten Ergebnisse mit der GR-Mutante GR(D4X) sowie die hier gezeigten Ergebnisse mit den Steroid-Analoga ZK57740 und ZK77945 den Schluß zu, daß eine Glucocorticoid-vermittelte Synthese des Inhibitorproteins $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ weder notwendig noch ausreichend ist, eine Hemmung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ durch den GR zu bewirken. Diese Interpretation wurde auch durch Untersuchungen mit anderen Steroidhormonrezeptoren bestätigt.

3.3.1.4 Andere Steroidhormonrezeptoren hemmen die Aktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ohne $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu induzieren

Für andere Steroidhormonrezeptoren ist ebenfalls bekannt, daß sie die Fähigkeit haben, AP-1 und $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -regulierte Gene zu reprimieren (Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Zhang et al., 1991b; Caldenhoven et al., 1995; Stein und Yang, 1995; Kalkoven et al., 1996; Keller et al., 1996). Wäre eine verstärkte Synthese des Inhibitorproteins $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ tatsächlich notwendig für eine hormonvermittelte Hemmung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, so sollten diese Steroidhormonrezeptoren ebenfalls in der Lage sein, die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Synthese zu induzieren. Um dies genauer zu analysieren, wurde die Fähigkeit des Progesteronrezeptors (PR), des

Androgenrezeptors (AR) sowie des Estrogenrezeptors (ER), I κ B α zu synthetisieren bzw. NF- κ B zu reprimieren, in *Western-Blot*-Analysen und transienten Transfektionsexperimenten verglichen (Abb. 18).

Für die *Western-Blot*-Analysen zur Bestimmung der I κ B α -Synthese wurden PR-positive menschliche T47D Mammakarzinom-Zellen mit dem synthetischen Progesteron R5020, AR-positive menschliche LNCaP Prostatakarzinom-Zellen mit dem Androgen Dihydrotestosteron (DHT) und ER-positive menschliche MCF-7 Mammakarzinom-Zellen mit 17 β -Estradiol behandelt. Dabei zeigte sich, daß R5020 die I κ B α -Synthese induzierte (Abb. 18A, vergleiche Spuren 1 und 2). Dies stimmt überein mit der bereits publizierten Beobachtung, daß der PR zur Repression der NF- κ B-Aktivität in der Lage ist (Kalkhoven et al., 1996). Im Gegensatz dazu induzierten weder DHT noch 17 β -Estradiol die I κ B α -Synthese (Abb. 18A, vergleiche Spur 3 mit 4 und Spur 5 mit 6), obwohl LNCaP-Zellen funktionellen AR und MCF-7-Zellen funktionellen ER enthalten. Da MCF-7-Zellen zusätzlich zum ER auch funktionellen GR enthalten, wurden diese Zellen als Kontrolle auch mit Dexamethason behandelt und diese Behandlung führte zu einem Ansteigen der I κ B α Proteinmenge (Abb. 18A, vergleiche Spur 5 und 7).

Da nun gezeigt wurde, daß weder DHT noch Estradiol eine I κ B α -Synthese vermitteln können, war die nächste Frage, wie diese Hormone sich bei der Repression NF- κ B-regulierter Gene verhalten. Hierzu wurde das NF- κ B-abhängige Reporterkonstrukt 3Enh-tk Luc mit multimerisierter NF- κ B-Bindestelle transient in LNCaP und MCF-7-Zellen, und zusätzlich ein Interleukin-6 Luciferase-Konstrukt in MCF-7-Zellen transfiziert. Für dieses IL-6-Reportergen war bereits gezeigt, daß seine Expression durch Estradiol gehemmt wird (Stein und Yang, 1995). Die Aktivität von NF- κ B und somit dieser Reporterkonstrukte wurde mit TNF α induziert. In diesen Transrepressions-Experimenten konnte DHT die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den AR vermitteln (Abb. 18B). Ebenso war Estradiol in der Lage, die Aktivität beider NF- κ B-abhängiger Reportergene zu reprimieren, und zwar in etwa genauso stark wie die Positivkontrolle Dexamethason (Abb. 18B). Die Tatsache, daß DHT und Estradiol trotzdem keinen Anstieg des I κ B α -Proteins bewirkten, zeigt, daß auch die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den AR und ER keine verstärkte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α erfordert.

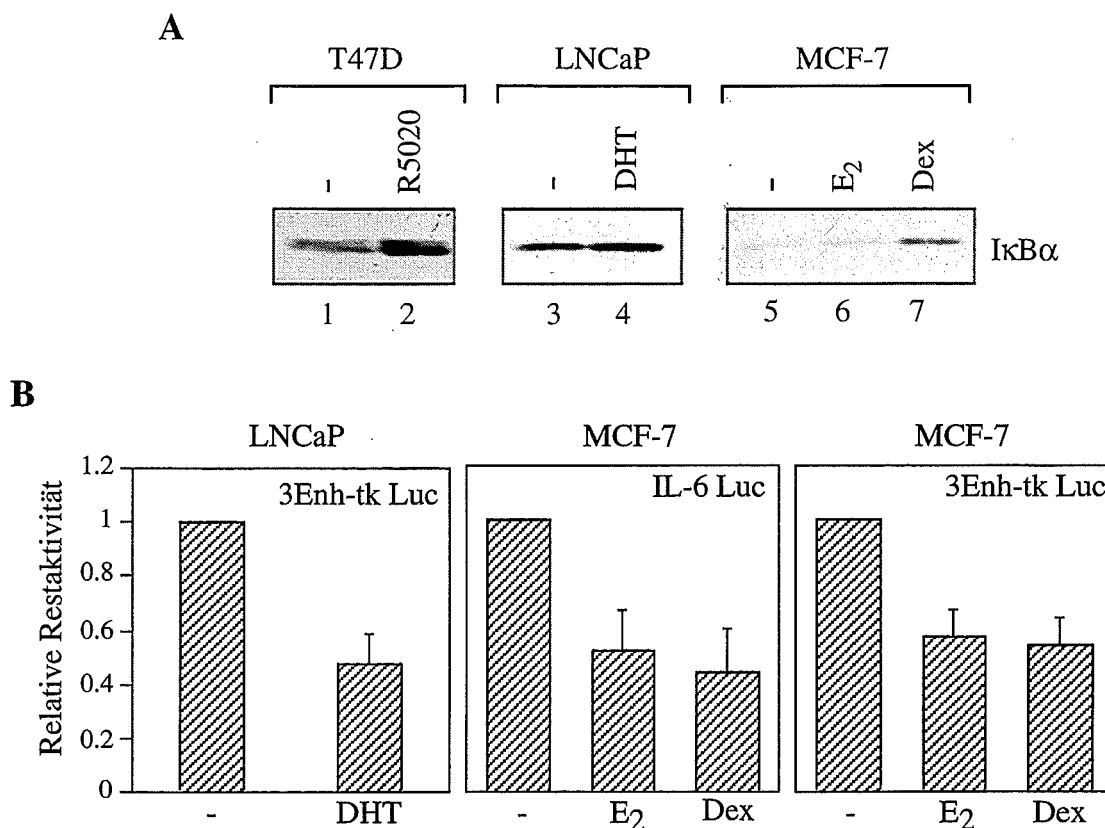


Abb. 18: Dihydrotestosteron und Estradiol hemmen die NF- κ B-Aktivität, ohne die I κ B α -Synthese zu induzieren. (A) *Western-Blot*-Analyse mit Proteinextrakten aus T47D, LNCaP und MCF-7-Zellen mit einem Antikörper gegen I κ B α . T47D-Zellen wurden mit 10^{-7} M des Progesterons R5020, LNCaP-Zellen mit 10^{-7} M Dihydrotestosteron (DHT) und MCF-7-Zellen mit 10^{-8} M 17β -Estradiol (E₂) oder 10^{-7} M Dexamethason für 2,5 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit der gleichen Menge an Protein in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach transferieren auf eine Membran wurde das I κ B α -Protein mit Hilfe eines anti-I κ B α -Antikörpers (1:1000) nachgewiesen. (B) Transrepression von NF- κ B-regulierten Genen durch DHT und E₂. LNCaP-Zellen wurden mit 5 μ g des NF- κ B-Reportergens 3Enh-tk Luc transient transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit TNF α (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10^{-7} M DHT für 30 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und mit jeweils gleicher Proteinmenge die Luciferase-Aktivität bestimmt. MCF-7-Zellen wurden entweder mit 10 μ g des IL-6-Reportergens -158/+11 IL-6-Luc oder mit 5 μ g des NF- κ B-Reportergens 3Enh-tk Luc transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne E₂ (10^{-8} M) oder Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Danach wurde TNF α zu einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugegeben. Nach 8 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit jeweils gleicher Proteinmenge die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse wurden aus dem Verhältnis zwischen der Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von TNF α und Hormon und derjenigen ohne Hormon nur in Anwesenheit von TNF α berechnet. Diese Restaktivität wurde relativ zu dem Wert 1 ausgedrückt, welcher nominell der Restaktivität in TNF α -behandelten Zellen in Abwesenheit von Hormon zugeordnet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Daten aus den letzten drei Kapiteln haben mit verschiedenen Ansätzen gezeigt, daß die hormonvermittelte gesteigerte Expression von I κ B α und die hormonvermittelte Repression der NF- κ B-Aktivität zwei voneinander unabhängige Ereignisse sind. Die NF- κ B-Aktivität kann ohne eine verstärkte I κ B α -Synthese erfolgen. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß die hormoninduzierte I κ B α -Synthese der Mechanismus ist, der der NF- κ B-Repression durch den GR zugrunde liegt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, welche Rolle der als zweite Möglichkeit diskutierte Mechanismus einer Protein-Protein-Interaktion bei der NF- κ B-Repression durch den GR spielt.

3.3.2 Protein-Protein-Interaktion zwischen NF- κ B und dem GR

Die negative Wirkung des GR auf die NF- κ B-Aktivität könnte dadurch zustande kommen, daß der GR direkt mit NF- κ B interagiert und dabei das Transaktivierungspotential von NF- κ B stört. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden zunächst geklärt, welche Bereiche des GR-Proteins notwendig sind, um die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B zu hemmen. In einem zweiten Schritt wurden dann *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, um herauszufinden, ob diese im ersten Teil erhaltenen funktionellen Daten mit der Fähigkeit des GR korrelieren, direkt mit NF- κ B zu interagieren.

3.3.2.1 Bereiche in der DNA-Bindedomäne und im Carboxy-Terminus des GR sind an der Hemmung der NF- κ B-Aktivität beteiligt

Um zu untersuchen, welche Bereiche des GR an der Repression der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B beteiligt sind, wurden verschiedene Deletionsmutanten des Rezeptorproteins verwendet. Sie sind in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Bei diesen GR-Mutanten fehlt entweder der größte Teil des Amino-Terminus (N-Terminus) (Δ 9-385), die DNA-Bindedomäne (DBD) (Δ 428-490), die Gelenk (*hinge*)-Region nach der DNA-Bindedomäne (Δ 491-515) oder zusätzlich zu der *hinge*-Region der Carboxy-Terminus (C-Terminus) (Δ 491-777).

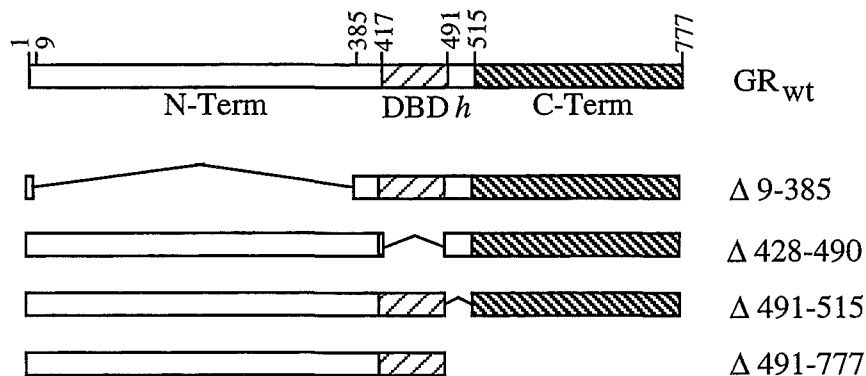


Abb. 19: Schematische Darstellung der verwendeten GR-Deletionsmutanten. Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur des Wildtyp-Glucocorticoidrezeptor-Proteins (GR_{wt}) sowie die Struktur verschiedener mutierter Rezeptorproteine. Die Zahlen über dem Wildtyp-GR bezeichnen die Positionen der Aminosäuren. Die mit Δ markierten Zahlen bezeichnen, bezogen auf den Wildtyp-GR, den in dem entsprechenden Rezeptorprotein fehlenden Aminosäurenbereich. N-Term: Amino-Terminus; DBD: DNA-Bindedomäne; *h*: *hinge*-Region; C-Term: Carboxy-Terminus.

In transienten Transfektionsexperimenten mit rezeptornegativen 293-Zellen wurde die Fähigkeit dieser GR-Deletionsmutanten analysiert, nach Hormoninduktion die NF- κ B-Aktivität an einem NF- κ B-abhängigen Luciferase Reporter gen (3Enh-tk Luc) zu reprimieren. Die NF- κ B-Aktivität

wurde in diesen Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ induziert. Als Kontrolle wurde gleichzeitig das Potential der Mutanten überprüft, die Transkription eines GR-abhängigen MMTV-Reporterplasmids ($\text{pHC}_{\text{wt}}\text{-Luc}$) nach Hormoninduktion zu aktivieren. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente anhand eines repräsentativen Beispiels.

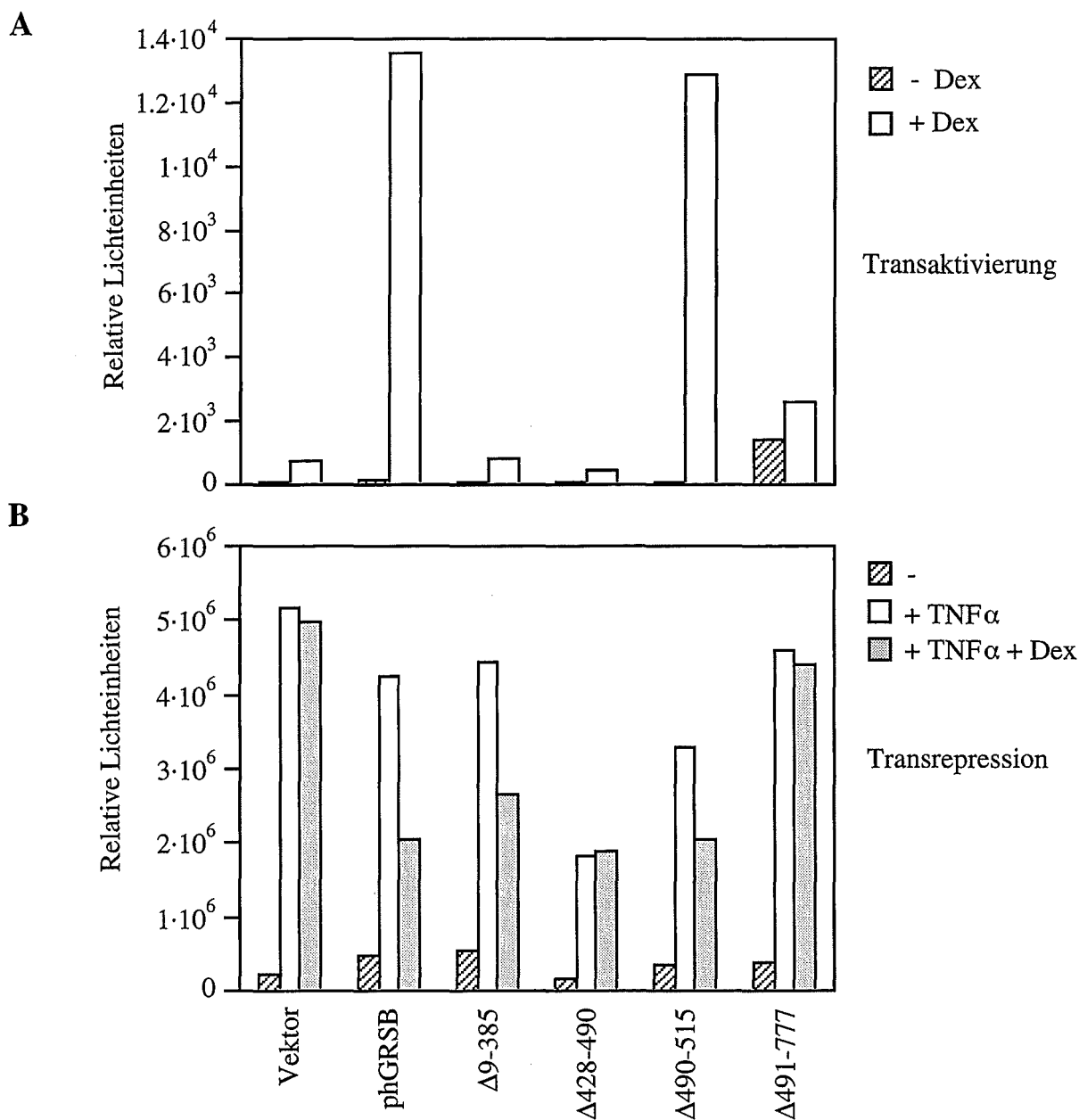


Abb. 20: Die Hemmung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität ist an die Anwesenheit der DNA-Bindedomäne und des Carboxy-Terminus des GR gekoppelt. (A) Transaktivierende Eigenschaften der GR-Deletionsmutanten. 293-Zellen wurden mit jeweils 6 μg des MMTV-Reportergens $\text{pHC}_{\text{wt}}\text{-Luc}$ und je 1 μg des Expressionsplasmides des leeren Vektors (pRShR^-), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der GR-Deletionsmutanten kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit Dexamethason (10^{-7} M) für 24 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität (als relative Lichteinheiten) mit jeweils gleichen Proteinmengen bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der

Ergebnisse

Luciferase-Aktivität als relative Lichteinheiten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.*
(B) Transreprimierende Eigenschaften der GR-Deletionsmutanten. 293-Zellen wurden mit jeweils 2 µg Expressionsplasmid des leeren Vektors (pRShR⁻), des Wildtyp-GR (phGRSB) oder der GR-Deletionsmutanten zusammen mit 0,5 µg des Reportergens 3Enh-tk Luc kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen, bzw. mit TNFα (5 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason (10⁻⁷ M) behandelt. Die Zellen wurden 24 h nach der Behandlung geerntet und die Luciferase-Aktivität mit jeweils gleicher Proteinmenge als relative Lichteinheiten bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Luciferase-Aktivität als relative Lichteinheiten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.*

(*Da in diesen Experimenten die basalen Werte der relativen Lichteinheiten sehr unterschiedlich waren, wurde auf eine zusammengefaßte Darstellung der Ergebnisse mit Standardabweichung verzichtet. Die relative Induktion bzw. relative Restaktivität der Reportergene zeigte jedoch zwischen den einzelnen Experimenten keine signifikanten Unterschiede.)

In den Transaktivierungs-Experimenten (Abb. 20A) verhielten sich die GR-Deletionsmutanten erwartungsgemäß (Hollenberg et al., 1987). Sowohl der Wildtyp-GR (phGRSB) als auch die Mutante mit der fehlenden *hinge*-Region (Δ 491-515) führten zu einer starken Aktivierung des MMTV-Reportergens (etwa 120-fach). (Für die im Falle des leeren Expressionsvektors (Vektor) zu beobachtende schwache Induktion gibt es augenblicklich keine Erklärung. Möglicherweise enthalten 293-Zellen doch noch eine endogene, dem GR vergleichbare Aktivität.) Die N-terminale Deletionsmutante (Δ 9-385) sowie die Mutante mit der fehlenden DNA-Bindedomäne (Δ 428-490) haben ihre Fähigkeit zur Transaktivierung annähernd komplett verloren. Auch die C-terminale Deletionsmutante (Δ 491-777), die keine Hormon-Bindedomäne mehr enthält, zeigte erwartungsgemäß nahezu keine hormoninduzierte Aktivierung des Reportergens mehr. Diese Deletionsmutante bewirkte jedoch schon in Abwesenheit von Hormon eine gewisse Induktion des Reportergens, d.h. sie besitzt noch teilweise das Potential zur Transaktivierung (Hollenberg et al., 1987; Godowski et al., 1988), da sie die konstitutiv aktive Transaktivierungsdomäne AF-1 noch enthält. (Um dies deutlich zu machen, wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Transfektionen die hier beschriebenen Experimente als Rohdaten (relative Lichteinheiten) dargestellt, und nicht als relative Induktionswerte.)

In den Experimenten zur Transrepression (Abb. 20B) zeigten der Wildtyp-GR (phGRSB) und die Mutante mit der fehlenden *hinge*-Region (Δ 491-515), aber auch die N-terminale Deletionsmutante (Δ 9-385) NF-κB-reprimierende Aktivität. In diesem N-terminalen Bereich des GR gibt es demzufolge keine Region, die für die NF-κB-Repression notwendig wäre, obwohl dieser Teil des Rezeptors absolut essentiell ist für die Transaktivierung von Zielgenen. Bei den Transfektionen mit der DBD-Deletionsmutante (Δ 428-490) sowie der C-terminalen Deletionsmutante (Δ 491-777) war dagegen ein kompletter Verlust der NF-κB-Repression durch Dexamethason zu beobachten. (Für die verringerte TNFα-Induktion im Falle der Mutanten Δ428-490 und Δ490-515 gibt es momentan keine Erklärung.)

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Bereiche in der DNA-Bindedomäne und im Carboxy-Terminus des GR für die Repression der NF-κB-Aktivität notwendig sind. Ob diese Bereiche auch an einer direkten Interaktion zwischen dem GR und NF-κB beteiligt sind, wurde im Anschluß untersucht.

3.3.2.2 Die beiden NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 interagieren mit einem Bereich im Carboxy-Terminus des GR

Die vorherrschende Form von NF- κ B ist ein Heterodimer aus den Protein-Untereinheiten p65 und p50, wobei p65 aufgrund einer Transaktivierungsdomäne im C-Terminus die transkriptionell aktive Einheit ist. In einem Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein-Interaktionstest wurde die Wechselwirkung zwischen dem GR und diesen beiden NF- κ B-Untereinheiten untersucht. Hierzu wurden bakteriell exprimierte und gereinigte GST-Fusionsproteine mit der p65- (GSTp65) und der p50-Untereinheit (GSTp50) von NF- κ B, sowie GST ohne Fusion als Negativkontrolle verwendet. Der Wildtyp-GR bzw. die in Abb. 19 dargestellten Deletionsmutanten des GR wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin *in vitro* translatiert und durch die Inkubation mit Dexamethason aktiviert. Die GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Agarose gekoppelt und mit den markierten Rezeptorproteinen inkubiert, um eine Bindung zu ermöglichen. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Resultat des Interaktionstests mit p65 ist in Abb. 21A, derjenige mit p50 in Abb. 21B dargestellt.

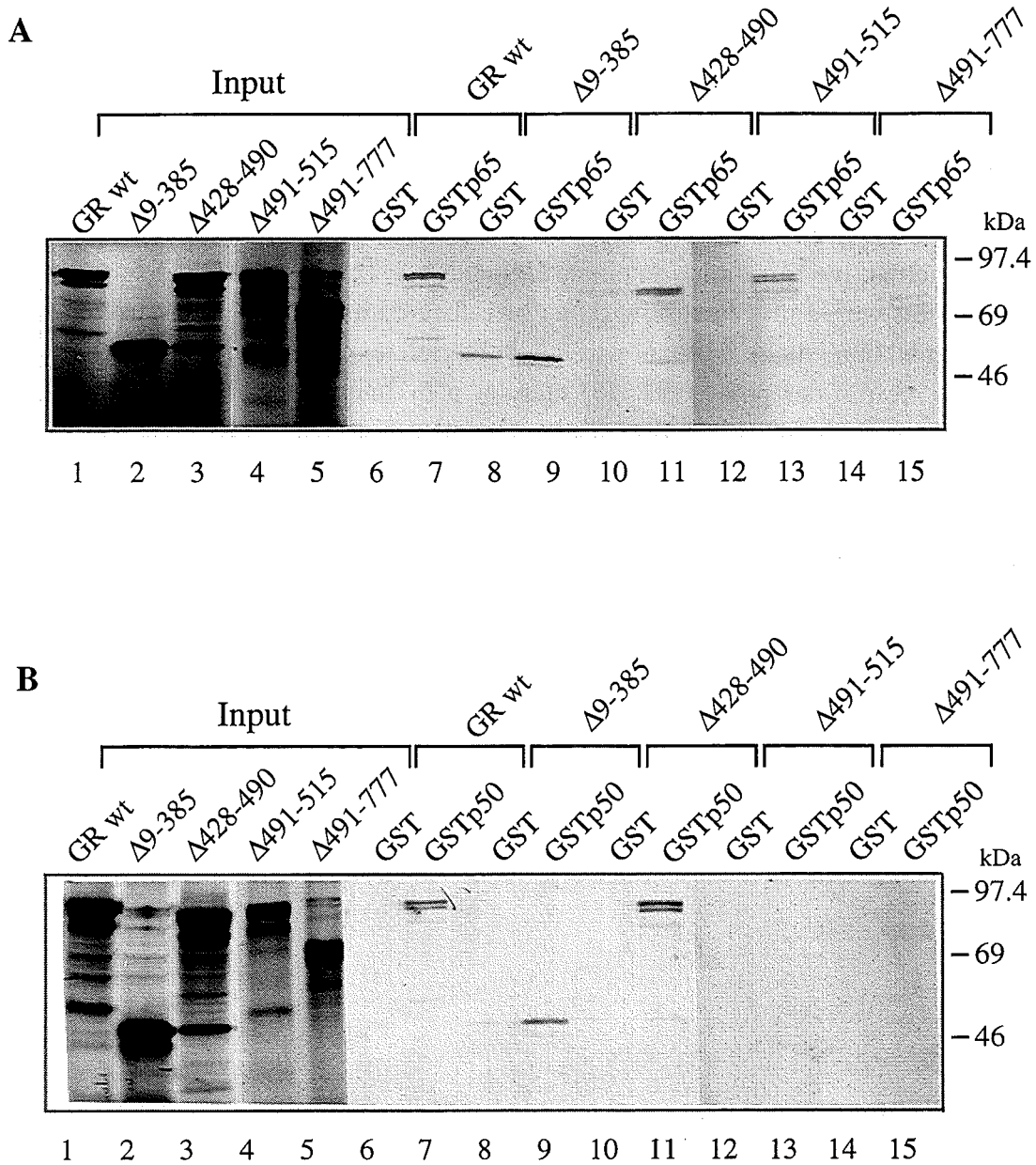


Abb. 21: Die Interaktion zwischen NF- κ B und dem GR erfordert den Carboxy-Terminus des GR. GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit der p65 (A) bzw. p50 (B) -Untereinheit von NF- κ B und *in vitro* translatierten GR-Deletionsmutanten. Bakteriell exprimiertes GST, bzw. GSTp65- (A) oder GSTp50- (B) Fusionsprotein wurde an Glutathion-Agarose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem und hormonaktiviertem GR_{wt} (10 μ l), bzw. den angegebenen GR-Deletionsmutanten (10 μ l) inkubiert. Es wurde die gleiche Menge (20 μ g) an GST, GSTp65 bzw. GSTp50 verwendet. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 1-5 wurde jeweils 1/10 der Menge des im Test eingesetzten *in vitro* translatierten Proteins aufgetrennt. Die Zahlen an der rechten Seite bezeichnen die Banden eines Molekulargewicht-Standards in kDa.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, daß der Wildtyp-GR (GR_{wt}) sowohl an GSTp65 als auch an GSTp50, nicht jedoch an GST alleine bindet (Abb. 21A und B, vergleiche Spur 6 und 7). Diese Bindung ist somit spezifisch. Ebenso waren auch die N-terminale Deletionsmutante (Δ 9-385) und die DBD-Deletionsmutante (Δ 428-490) in der Lage, spezifisch an GSTp65 und GSTp50 zu binden (Abb. 21A und B, Spur 9 und Spur 11). Die Deletionsmutante mit der fehlenden *hinge*-Region (Δ 491-515) zeigte jedoch ein unterschiedliches Bindungsverhalten an p65 und p50. Während dieses Rezeptorprotein noch spezifisch mit GSTp65 interagiert (Abb. 21A, Spur 13), war eine Bindung an GSTp50 nicht mehr zu beobachten (Abb. 21B, Spur 13). Dagegen war die C-terminale Deletionsmutante (Δ 491-777) weder zu einer Interaktion mit GSTp65 noch mit GSTp50 in der Lage (Abb. 21A und B, Spur 15).

Aus der Interpretation dieser Ergebnisse ergibt sich, daß die NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 im C-terminalen Bereich des GR-Proteins binden. Die Interaktionsstelle mit NF- κ B liegt vermutlich nahe der DNA-Bindedomäne, da für eine Bindung mit p50 die *hinge*-Region (Aminosäuren 491-515) notwendig ist und p65 und p50 ein Heterodimer bilden. Trifft diese Vermutung zu, so sollten andere C-terminale Deletionsmutanten, die diesen mutmaßlichen Interaktionsbereich noch enthalten, auch noch mit p65 und p50 interagieren. Dies wurde in einem Interaktionstest mit zwei weiteren C-terminalen Deletionsmutanten überprüft.

Die hierzu verwendeten Mutanten sind in Abbildung 22A dargestellt. Es handelt sich dabei um eine Mutante, bei der C-terminal die Aminosäuren 748-777 deletiert sind, der zweiten Mutante fehlt der C-terminale Aminosäurenbereich von Position 597-777. Mit *in vitro* translatierten Proteinen dieser Mutanten und bakteriell exprimiertem GSTp65 und GSTp50 wurde analog zu Abbildung 21 ein GST-Fusionsprotein-Interaktionstest durchgeführt (Abb. 22B und C).

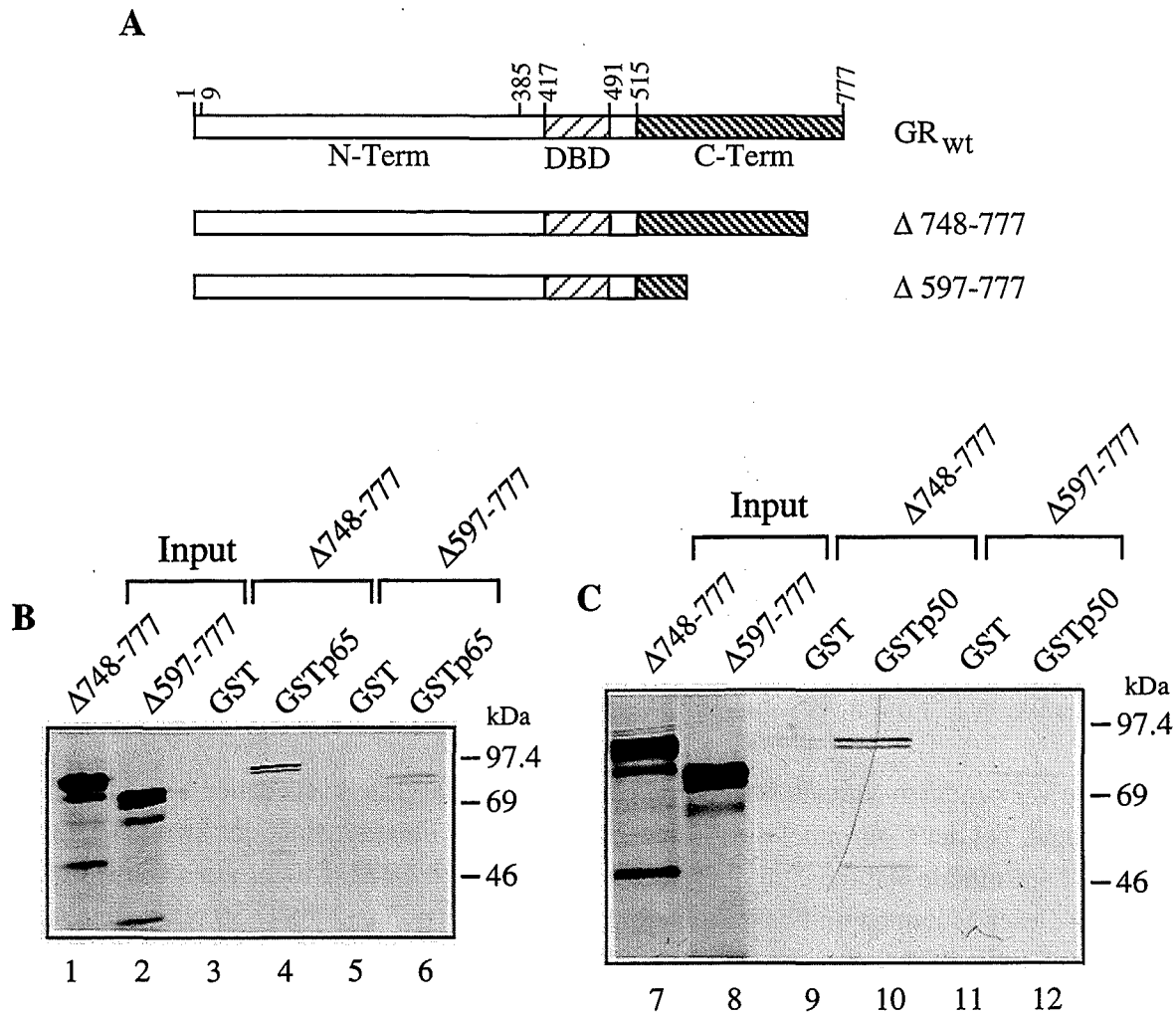


Abb. 22: Die beiden NF-κB-Untereinheiten p65 und p50 interagieren mit einem Bereich im Carboxy-Terminus des GR nahe der DNA-Bindedomäne. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Carboxy-terminalen Deletionsmutanten des GR. Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur des Wildtyp-Glucocorticoidrezeptors (GR_{wt}) sowie die Struktur zweier mutierter Rezeptorproteine. Die Zahlen über dem Wildtyp-GR bezeichnen die Positionen der Aminosäuren. Die mit Δ markierten Zahlen bezeichnen, bezogen auf den Wildtyp-GR, den in dem entsprechenden Rezeptorprotein fehlenden Aminosäurebereich. N-Term: Amino-Terminus; DBD: DNA-Bindedomäne; C-Term: Carboxy-Terminus. **(B)** GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit der p65- bzw. **(C)** p50-Untereinheit von NF-κB und *in vitro* translatierten Carboxy-terminalen Deletionsmutanten des GR. Bakteriell exprimiertes GST, bzw. GSTp65- **(B)** oder GSTp50- **(C)** Fusionsprotein wurde an Glutathion-Agarose gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem und hormonaktiviertem GR_{wt} (10 μl), bzw. den angegebenen C-terminalen Deletionsmutanten (10 μl) inkubiert. Es wurde die gleiche Menge (20 μg) an GST, GSTp65 bzw. GSTp50 verwendet. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 1 und 2 bzw. 7 und 8 wurde jeweils 1/10 der Menge des im Test eingesetzten *in vitro* translatierten Proteins aufgetrennt. Die Zahlen an der rechten Seite bezeichnen die Banden eines Molekulargewicht-Standards in kDa.

Bei diesem Interaktionstest interagierte die Deletionsmutante Δ748-777, bei der nur ein kleiner Teil des C-Terminus deletiert war, sowohl mit GSTp65 als auch mit GSTp50, nicht aber mit

GST alleine (Abb. 22B, Spur 3 und 4, sowie C, Spur 9 und 10). Dagegen war mit der Deletionsmutante Δ 597-777 nur noch eine sehr schwache Bindung an GSTp65 und nahezu keine Bindung an GSTp50 zu beobachten (Abb. 22B, Spur 6, sowie C, Spur 12). Dies könnte bedeuten, daß an Aminosäureposition 597 gerade die Region erreicht ist, die für eine Bindung von p65 und p50 an den GR notwendig ist.

Zusammen mit den mit der *hinge*-Deletionsmutante (Δ 491-515) und der C-terminalen Deletionsmutante (Δ 491-777) erhaltenen Daten aus Abb. 21 lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die Interaktion zwischen dem GR und p65/p50 den Aminosäurebereich von Position 491 bis 597 in der Carboxy-terminalen Region des GR erfordert.

Nachdem nun die Bereiche des GR, die für die Hemmung der NF- κ B-Aktivität notwendig sind (Kapitel 3.3.2.1), sowie die für eine direkte Interaktion mit NF- κ B erforderlichen Bereiche (Kapitel 3.3.2.2) definiert wurden, stellte sich die Frage, ob sich zwischen den funktionellen Daten und den Interaktionsstudien ein Zusammenhang herstellen läßt. Hierzu wurden die Daten aus beiden Untersuchungen nochmals in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Vergleich der Interaktion zwischen GR-Deletionsmutanten und p65/p50 mit der NF- κ B-reprimierenden Aktivität dieser Mutanten. Die Darstellung der GR-Deletionsmutanten entspricht Abbildung 19. Die Daten für die Interaktion mit p65 und p50 ergaben sich aus Abbildung 21, die funktionellen Daten für die NF- κ B-Repression aus Abbildung 20.

	Interaktion mit		Repression der NF- κ B Aktivität
	p65	p50	
 GR _{wt}	+	+	+
 Δ 9-385	+	+	+
 Δ 428-490	+	+	-
 Δ 491-515	+	-	+
 Δ 491-777	-	-	-

Aus dieser Zusammenstellung ergeben sich zwei Schlußfolgerungen:

- (i) Eine Interaktion zwischen dem GR und der transkriptionell aktiven p65-Untereinheit von NF- κ B (nicht jedoch der p50-Untereinheit) ist absolut notwendig für eine Repression der NF- κ B-Aktivität. Bei Verlust der Interaktion kann auch keine Repression mehr stattfinden (siehe Δ 491-777).
- (ii) Offensichtlich reicht diese Interaktion alleine jedoch nicht aus, um die Repression zu vermitteln, da die DBD-Deletionsmutante Δ 428-490 zwar mit p65 interagiert, die NF- κ B-Aktivität aber dennoch nicht reprimieren kann. Es muß also noch eine weitere Determinante geben, die nach einer erfolgten Interaktion zwischen GR und NF- κ B dazu führt, daß NF- κ B nicht mehr transkriptionell aktiv sein kann. Die Funktion dieser Determinante ist offenbar von der Anwesenheit der DNA-Bindedomäne des GR abhängig.

Zusammengefaßt machen es die Untersuchungen aus Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2 wahrscheinlich, daß eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B, und nicht eine GR-induzierte Synthese von I κ B α die Grundlage für die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den GR bildet.

4 Diskussion

4.1 Trennung von positiver und negativer Genregulation

Wie andere Steroidhormonrezeptoren beeinflusst der Glucocorticoidrezeptor (GR) nach Bindung seines Liganden im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression spezifischer Gene. Diese Veränderungen in der Genexpression bilden die Basis der Wirkung von Glucocorticoid-Hormonen. Dabei ist der GR in der Lage, die Expression von Genen sowohl positiv als auch negativ zu regulieren. Die Mechanismen für eine positive Regulation der Genexpression durch den GR sind relativ gut bekannt. Obwohl bisher unklar ist, wie der GR letztendlich mit der Transkriptionsmaschinerie kommuniziert, steht fest, daß seine Bindung als Homodimer an klassische GREs im Promotor hormoninduzierbarer Gene notwendig ist, um deren Transkription zu aktivieren. Die Frage, ob die Repression der Genexpression durch den GR durch die gleichen Faktoren vermittelt wird, konnte bislang nicht klar beantwortet werden. Folgende Hinweise ließen vermuten, daß dies nicht der Fall ist: (i) Der GR reprimiert AP-1-abhängige Promotoren, die kein klassisches GRE enthalten und verhindert auch nicht die Besetzung der AP-1-Bindestelle in diesen Promotoren (Jonat et al., 1990; König et al., 1992). (ii) Transrepression durch den GR erfolgt schon bei niedrigeren Hormonkonzentrationen als die Aktivierung eines klassischen GRE-Promotors (Jonat et al., 1990), was dahingehend interpretiert werden könnte, daß Transrepression auch durch Rezeptor-Monomere erfolgen kann, während für die Transaktivierung Dimere erforderlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Transaktivierung von Genen und die Transrepression AP-1- und NF- κ B-regulierter Gene zwei unterschiedliche Eigenschaften des GR sind und getrennt werden können. Dies war mit Hilfe von Punktmutanten und synthetischen Liganden des Rezeptors möglich.

4.1.1 Unterscheidung durch Mutanten des GR

Punktmutationen in der Dimerisierungsdomäne (siehe Gruppe II-Mutanten, Abb. 4) innerhalb der DNA-Bindedomäne (DBD) des GR, die die Dimerisierung und DNA-Bindung von Rezeptorproteinen behindern (Umesono und Evans, 1989; Dahlman-Wright et al., 1991; Heck et al., 1994), resultierten in transaktivierungsdefekten Rezeptormutanten. Dennoch konnten diese Mutanten die Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B reprimieren. Dies konnte nicht nur in transienten Transfektionsexperimenten gezeigt werden, sondern wurde auch mit einer stabil transfizierten GR-Mutante bestätigt. Diese Daten lassen vermuten, daß im Gegensatz zur Transaktivierung, die Repression AP-1 und NF- κ B-regulierter Gene durch GR-

Monomere erfolgt. Andere Mitglieder der Steroid/Thyroid-Rezeptor Familie, wie beispielsweise der Thyroidhormon (TR)- und der Retinsäure (RAR)-Rezeptor, können ebenfalls die AP-1-Aktivität reprimieren. Im Gegensatz zum GR hängt ihre Dimerisierung jedoch zusätzlich zur Dimerisierungsdomäne in der DBD noch stark von einem Bereich in ihrer Hormon-Bindedomäne ab (zur Übersicht siehe Glass, 1994). In diesem Falle wäre es schwieriger und ist bisher auch nicht gelungen, analog zum GR, dimerisierungsdefekte Mutanten zu erzeugen. Hinsichtlich der hier dargestellten Daten würde man jedoch voraussagen, daß auch solche Mutanten ihre Fähigkeit zur AP-1-Repression beibehalten.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten GR-Mutanten mit Defekt in der Dimerisierungsdomäne wurde schon seit längerem eine weitere transaktivierungsdefekte Mutante des Ratten-GR beschrieben (LS-7), die ebenfalls die AP-1-Aktivität noch reprimieren kann (Sчена et al., 1989; Yang-Yen et al., 1990). Hier wurde gezeigt, daß diese Mutante auch zur Repression der NF- κ B-Aktivität in der Lage ist. Als die LS-7-Mutante in dieser Arbeit jedoch als dissoziierender Rezeptor in stabilen Transfektionen verwendet werden sollte, zeigte sich, daß sie noch ein schwaches, aber meßbares Potential zur Transaktivierung besitzt. Der Grund hierfür ist möglicherweise, daß diese Mutante zwar zwei Punktmutationen in der DBD trägt, aber trotzdem noch an die DNA binden kann (Sचना et al., 1989). Dies könnte es dem mutierten Rezeptor ermöglichen, unter bestimmten Bedingungen Transaktivierung zu vermitteln.

Gegenwärtig ist in der Literatur nur eine Mutation beschrieben, die umgekehrt wie die dimerisierungsdefekten Mutanten die AP-1-reprimierende Eigenschaft des GR zerstört, die Transaktivierung an einem klassischen GRE jedoch noch, wenn auch abgeschwächt, erlaubt (Starr et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine Punktmutation von Lysin zu Alanin an der Basis des linken Zinkfingers in der DBD des Ratten-GR (K461A), die der Position 442 im menschlichen GR entspricht. Dies zeigt deutlich, daß in der DBD des GR auch Aminosäuresequenzen existieren, die für die transreprimierende Eigenschaft des GR notwendig sind. Der Versuch, in dieser Arbeit entsprechende Mutationen zu identifizieren, war jedoch nicht erfolgreich. Die Beobachtung, daß einige der Gruppe I-Mutanten (Abb. 4) die AP-1-Aktivität an einem Reporterkonstrukt mit multimerisierter AP-1-Bindestelle nicht mehr reprimierten, konnte unter Verwendung eines Kollagenase I-Reporterkonstrukts mit nur einfacher AP-1-Bindestelle nicht bestätigt werden. Es ist denkbar, daß die Regulation dieser beiden Reporterkonstrukte durch verschiedene AP-1-Untereinheiten erfolgt, die das Verhalten der GR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-GR unterschiedlich beeinflussen. AP-1 ist ein Komplex, der aus Hetero- oder Homodimeren aus der Jun/Fos-Familie von Transkriptionsfaktoren zusammengesetzt sein kann. Es wäre nicht ungewöhnlich, daß ein Unterschied in den Komponenten besteht, die an eine multimerisierte AP-1-Bindestelle im Gegensatz zu einer einfachen Bindestelle gebunden sind. Für JunB wurde beispielsweise beschrieben, daß es die Transkription zwar an Promotoren mit multimerisierter AP-1-Bindestelle, nicht aber an solchen mit einfacher Bindestelle induzieren kann (Chiu et al., 1989). Solange jedoch nicht klar gezeigt ist, welche AP-1-Mitglieder an welchen Promotor binden,

bleibt es schwierig festzustellen, weshalb einige der Gruppe I-Mutanten in dem einen Falle die AP-1-Aktivität noch reprimieren, im anderen Falle jedoch nicht.

Dennoch zeigen die in dieser Arbeit und die von anderen Gruppen beschriebenen Daten, daß GR-Mutanten erhalten werden können, die selektiv entweder nur die transaktivierende oder nur die transeprimierende Eigenschaft des GR beibehalten. Dies könnte darauf hinweisen, daß diese beiden genregulatorischen Funktionen von unterscheidbaren molekularen Eigenschaften des GR determiniert werden.

4.1.2 Unterscheidung durch Liganden des GR

In diesem Zusammenhang wurde weiterhin gezeigt, daß positive und negative Genregulation durch den GR auch durch die geeignete Wahl synthetischer Liganden des Rezeptors unterschieden werden kann.

Frühere Ergebnisse, nach denen sich als Antagonisten des GR klassifizierten Steroid-Analoga wie beispielsweise RU486 zur Unterscheidung zwischen transaktivierender und transeprimierender Funktion des GR eignen (Heck et al., 1994), konnten hierbei jedoch nur bedingt bestätigt werden. Die Beobachtung, daß diese Steroid-Analoga trotz mangelnder transaktivierender Wirkung die Repression eines AP-1-abhängigen Reportergens vermitteln können, beruhte auf transienten Transfektionsexperimenten mit einem Reporterkonstrukt mit multimerisierter AP-1-Bindestelle, bei denen der GR durch Kotransfektion überexprimiert wurde (Heck et al., 1994). Offenbar führten diese Bedingungen zu einer Situation, bei der der Effekt dieser Steroide auf die AP-1-Hemmung unphysiologisch verstärkt wurde. Die in dieser Arbeit beobachtete reprimierende Wirkung von RU486 und ZK98299 auf die Expression des endogenen Kollagenase I-Gens, vermittelt durch den endogenen GR, war wesentlich schwächer, als in diesen transienten Transfektionen. Ähnliches wurde auch in anderen Untersuchungen beobachtet (Vayssiere et al., 1997). Somit eignet sich diese Klasse von Steroid-Analoga nicht zur Unterscheidung der genregulatorischen Eigenschaften des GR.

Dagegen konnten innerhalb einer weiteren Gruppe von Liganden im Rahmen dieser Arbeit die Steroid-Analoga ZK57740 und ZK77945 charakterisiert werden, die eine Transaktivierung von Zielgenen des GR vermitteln, jedoch keine oder nur schwache reprimierende Aktivität auf AP-1- und NF- κ B-regulierte Gene zeigten. Ergänzend hierzu wurde kürzlich eine Gruppe von synthetischen Steroid-Analoga beschrieben, die in einer umgekehrten Situation zwar noch die Repression der AP-1-Aktivität durch den GR bewirken, jedoch keine Transaktivierung mehr vermitteln (Vayssiere et al., 1997). Auch im Falle des Retinsäurerezeptors (RAR) sind solche dissoziierenden synthetischen Liganden beschrieben, die entweder nur Transaktivierung oder nur Repression der AP-1-Aktivität bewirken (Fanjul et al., 1994; Chen et al., 1995). Die in dieser Arbeit charakterisierten Steroid-Analoga liefern darüber hinaus insofern weitere Information, als ihre reprimierende Wirkung nicht nur auf die AP-1-Aktivität, sondern auch auf die Aktivität von NF- κ B untersucht wurde. Da die dissoziierenden Liganden weder die AP-1-

noch die NF- κ B-Aktivität hemmen konnten, läßt sich vermuten, daß die transkriptionelle Interferenz zwischen dem GR und diesen beiden Transkriptionsfaktoren auf einem ähnlichen Mechanismus beruht.

Wie im Falle der GR-Mutanten, die selektiv entweder nur zur Transaktivierung oder nur zur Repression in der Lage sind, läßt sich auch bei den dissoziierenden Liganden eine spezifische molekulare Eigenschaft des GR postulieren, die diese Effekte vermittelt. Dabei stellt sich die Frage, wie es dazu kommt, daß der GR in einer Situation, in der er die Expression eines Gens reprimiert, selbst transkriptionell inaktiv ist, obwohl er doch potentielle Transaktivierungsdomänen besitzt. Die Vermutung liegt nahe, daß eine spezifische Konformation des Rezeptorproteins dabei eine Rolle spielt, innerhalb derer beispielsweise die Transaktivierungsdomänen des GR maskiert sind. Diese Interpretation beruht auf Daten, die mit Hilfe eines partiellen proteolytischen Verdauens oder durch Analyse der Kristallstruktur beispielsweise für den PR und ER gezeigt haben, daß vor allem die Transaktivierungsfunktion AF-2 im C-Terminus der Rezeptoren nach Ligandenbindung eine drastische strukturelle Veränderung durchmacht und verschiedene Liganden unterschiedliche Konformationen des Rezeptorproteins bewirken (Allan et al., 1992; Allan et al., 1996; Brzozowski et al., 1997). So könnte man sich vorstellen, daß ein Rezeptor, der einen dissoziierenden Liganden gebunden hat, bzw. auch ein mutierter Rezeptor, in einer Konformation arretiert ist, die es ihm nur noch erlaubt, eine der beiden genregulatorischen Eigenschaften auszuüben. Für den PR und ER gibt es in jüngster Zeit Hinweise dafür, daß als molekulare Konsequenz einer solchen Konformation es dem Rezeptor ermöglicht wird, selektiv Koaktivatoren oder auch Korepressoren zu rekrutieren, die dann den Verlauf der Transkription beeinflussen (Jackson et al., 1997; Smith et al., 1997).

4.2 Unterscheidung verschiedener Mechanismen der negativen Genregulation

Bei einer wie oben beschriebenen Unterscheidung zwischen positiver und negativer Genregulation durch den GR muß auch immer berücksichtigt werden, daß im Gegensatz zur Aktivierung der Genexpression bisher noch kein einheitliches Modell für die Repression von Genen durch den GR formuliert wurde. Dies wird dadurch erschwert, daß der GR die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene mit ganz unterschiedlichem Promotor-Kontext reprimiert. Da die Repression der Genexpression durch Glucocorticoide mit deren entzündungshemmender und immunsuppressiver Wirkung in Verbindung gebracht wird, wäre es von Interesse zu wissen, ob diese Effekte durch einen einheitlichen Mechanismus vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mit Hilfe der dimerisierungsdefekten Gruppe II-GR-Mutanten, die nicht mehr DNA binden und transaktivieren, ein Vergleich der Transrepression an verschiedenen Zielgenen des GR durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß diese Mutanten zwar noch die Expression AP-1- und NF- κ B-regulierter Gene reprimieren konnten, nicht jedoch diejenige des Prolaktin-Gens, dessen Promotor ein negatives GRE enthält.

Demnach existieren offensichtlich mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen der GR-vermittelten Transrepression: ein DNA-unabhängiger Mechanismus (Typ A, siehe Tab. 2), der vermutlich auf der Ausbildung eines inaktiven Komplexes durch Protein-Protein-Interaktion basiert (im Falle der Interferenz mit AP-1 und NF- κ B; zu NF- κ B siehe auch 4.3), und ein DNA-abhängiger Mechanismus (Typ B, siehe Tab. 2), dem eine Konkurrenz um überlappende Bindestellen zugrunde liegt (im Falle des Rinder Prolaktin-Gens). Dieser Repressionsmechanismus vom Typ B ist von den gleichen Faktoren abhängig (Dimerisierung und DNA-Bindung) wie der Mechanismus der Transaktivierung durch den GR an einem klassischen GRE.

Ob auch die Transrepression anderer Glucocorticoid-reprimierter Gene einem dieser beiden Mechanismen zugeteilt werden kann, bleibt zu überprüfen, ist jedoch wahrscheinlich. Die bisher zur Verfügung stehenden Daten lassen vermuten, daß auch die Repression weiterer Zielgene mit sogenanntem negativen GRE im Promotor dem DNA-abhängigen Mechanismus vom Typ B zugeordnet werden kann (z.B. Osteocalcin-Gen (Strömstedt et al., 1991), Corticotropin *Releasing* Hormon-Gen (Malkoski et al., 1997)). Dagegen ist es wahrscheinlich, daß weitere AP-1 und NF- κ B-regulierte Gene, in deren Promotor sich keine Bindestelle für den GR befindet, nach einem DNA-unabhängigen Mechanismus vom Typ A durch den GR reprimiert werden. Hierzu gehört der Großteil der Gene, die eine Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen spielen (siehe Tab. 1).

Schwierig wird die Zuordnung zu einem dieser beiden Mechanismen in Fällen, bei denen sich im Promotor des Zielgens überlappende Bindestellen für AP-1 und den GR befinden (sogenanntes *composite* GRE), wie beispielsweise im Maus Proliferin-Gen (Mordacq und Linzer, 1989; Diamond et al., 1990). Ob der GR zur Repression der Transkription des Proliferin-Gens tatsächlich an dieses *composite* GRE bindet, muß durch *in vivo* DNA-Bindungsstudien geklärt werden. Aufgrund der Nähe ihrer beiden Bindestellen ist es sehr wahrscheinlich, daß am Promotor dieses Gens auch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GR und AP-1 stattfindet. Im Gegensatz zu einem klassischen und einem negativen GRE ist der GR in Abwesenheit von AP-1 nicht zu einer Regulation des Proliferin-Gens in der Lage. Nur nach Bindung eines cJun/c-Fos-Heterodimers an das *composite* GRE reprimiert der aktivierte GR die Transkription dieses Gens. In Anwesenheit von c-Jun/c-Jun-Homodimeren verstärkt der GR jedoch sogar die AP-1-induzierte Transkription (Miner und Yamamoto, 1992). Dasselbe Verhalten wurde interessanterweise auch bei der Interferenz des GR mit AP-1 am Kollagenase I-Gen beobachtet (Teurich und Angel, 1995), was ein Indiz dafür sein könnte, daß der Mechanismus der Repression der AP-1-Aktivität am Proliferin-Gen und Kollagenase I-Gen sehr ähnlich ist. Offenbar bestimmt in beiden Fällen die Art der Protein-Protein-Interaktion den Verlauf der Genregulation durch den GR. Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, daß die Repression von AP-1 am *composite* GRE des Proliferin-Gens eher dem DNA-unabhängigen Repressions-Mechanismus vom Typ A zugeordnet werden kann, der, wie im Falle der Repression des Kollagenase I-Gens, auf einer Protein-Protein-Interaktion zwischen GR und AP-1 beruht.

Ein entsprechender Vergleich und eine ähnliche Einteilung von verschiedenen Mechanismen der Transrepression durch den GR wurde kürzlich auch von Meyer et al., 1997, beschrieben. In dieser Studie wurde die Repression an einem negativen GRE und die Repression der AP-1-Aktivität sowohl am Kollagenase I-Gen, als auch am *composite* GRE des Maus Proliferin-Gens analysiert und mit der Transaktivierung an einem klassischen GRE verglichen. Dabei konnte mit Hilfe einer Mutante in der DBD des Ratten-GR (K461A, entsprechend K442A im menschlichen GR; Starr et al., 1996; siehe auch 4.1) ebenfalls zwischen zwei verschiedenen Mechanismen der Transrepression unterschieden werden: Während diese Mutante zur Repression der AP-1-Aktivität weder am Kollagenase I-Gen noch am *composite* GRE des Proliferin-Gens in der Lage war, konnte sie die Transkription an einem negativen GRE noch hemmen sowie die Transaktivierung an einem klassischen GRE noch vermitteln. Dies entspricht der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Einteilung der Mechanismen der transkriptionellen Repression durch den GR.

4.3 Transkriptionelle Interferenz zwischen dem GR und NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert positiv die Expression vieler Gene, die an Entzündungs- und Immunreaktionen beteiligt sind und ist deshalb ein wichtiger regulatorischer Faktor bei diesen Prozessen. Der Mechanismus der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Glucocorticoide ist deshalb von großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse.

Aufgrund zweierlei Daten wurden zwei Modelle vorgeschlagen, nach denen der GR die NF- κ B-Aktivität reprimieren könnte (siehe auch Abb. 3): durch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen NF- κ B-Untereinheiten und dem GR (Ray und Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b) oder durch eine GR-vermittelte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995a). Hierbei würde neusynthetisiertes I κ B α die NF- κ B-Funktion inhibieren, indem es NF- κ B im Cytoplasma in einer inaktiven Form zurückhält. Im letzteren Falle würde die positive genregulatorische Eigenschaft des GR indirekt eine reprimierende Wirkung auf die NF- κ B-Aktivität ausüben.

Die relative Bedeutung dieser beiden postulierten Mechanismen in Bezug auf die Repression der NF- κ B-Aktivität durch den GR wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

4.3.1 Glucocorticoid-induzierte Synthese des Inhibitorproteins I κ B α

In einem ersten Schritt wurde zunächst überprüft, wie die hormoninduzierte Synthese des I κ B α -Proteins zustande kommt. Dabei wurde gezeigt, daß Glucocorticoide die Transkription des I κ B α -Gens an dessen Promotor induzieren können, was zu einer I κ B α -mRNA-Synthese führt. Dies wurde durch Ergebnisse bestätigt, die zeigen, daß die hormoninduzierte I κ B α -mRNA-Synthese durch Actinomycin D gehemmt wird und Dexamethason die Halbwertszeit der

I κ B α -mRNA nicht verändert, d.h. der Effekt nicht auf eine Stabilisierung der I κ B α -mRNA zurückzuführen ist (Heck et al., 1997).

Der Promotor des menschlichen I κ B α -Gens trägt zwischen den Positionen -93 und -73 das Sequenz-Motiv **GGACGAAGCCAGTTCT**, welches die in einer GR-Bindestelle vorkommende konservierte Hexanukleotid-Folge A/TGTTCT (unterstrichen) enthält, sowie drei der vier Kontaktstellen (fett gedruckt), die eine Bindung des GR an die DNA ermöglichen (Beato, 1989; Scheidereit et al., 1989). Dieses Rezeptor-Bindemotiv ist möglicherweise für die Regulation des I κ B α -Promotors durch Glucocorticoide verantwortlich. Im menschlichen I κ B α -Promotor ist dieses mutmaßliche GRE zwischen zwei Bindestellen für NF- κ B (Ito et al., 1994) lokalisiert. Im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus wird das I κ B α -Gen selbst durch NF- κ B positiv reguliert. Vermutlich ist die benachbarte Lage dieser Bindestellen für den in dieser Arbeit beobachteten synergistischen Effekt von TPA und Dexamethason am I κ B α -Promotor verantwortlich. Solch eine Kooperation von Faktoren, die sich normalerweise gegenseitig in ihrer Aktivität inhibieren, wurde auch schon für GR und AP-1 am Promotor des Metallothionein-Gens beschrieben (Jonat, 1990; Wade et al., 1995). Dies ist übereinstimmend mit weiteren Daten, die zeigen, daß der GR nicht nur die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren hemmt, sondern auch mit anderen Transkriptionsfaktoren an verschiedenen Promotoren bei der Induktion der Transkription kooperiert (Cato et al., 1988; Schüle et al., 1988; Strähle et al., 1988).

Ein Hinweis darauf, daß die beschriebene Glucocorticoid-induzierte Synthese von I κ B α möglicherweise nichts mit der Repression der NF- κ B-Aktivität zu tun hat, ergab sich aus der Beobachtung, daß die Hemmung der NF- κ B-Aktivität am ICAM-1-Gen durch den GR unabhängig von einer Protein-Neusynthese ist (van de Stolpe et al., 1993). In dieser Arbeit konnte dann deutlich gezeigt werden, daß eine durch Glucocorticoide erhöhte I κ B α -Proteinmenge für eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität nicht notwendig ist. Diese Schlußfolgerung basiert auf folgenden experimentellen Ergebnissen: Eine dimerisierungsdefekte Mutante des GR, die weder Glucocorticoid-regulierte Gene transaktivierte, noch die I κ B α -Synthese induzierte, ist immer noch in der Lage, die NF- κ B-Aktivität zu reprimieren. Da dieser Rezeptor die I κ B α -Synthese nicht mehr induzieren konnte, ist es wahrscheinlich, daß die Ausbildung eines Rezeptor-Dimers sowie die Erkennung und Bindung eines klassischen GREs tatsächlich für eine I κ B α -Synthese durch Glucocorticoide notwendig sind. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, daß der Progesteronrezeptor (PR), der ein GRE erkennt (von der Ahe et al., 1985), ebenfalls die I κ B α -Synthese induziert. Im Gegensatz dazu waren der Androgenrezeptor (AR), der bevorzugt eine verwandte aber andere Bindestelle erkennt (Adler et al., 1991 und 1992; Claessens et al., 1996), sowie der Estrogenrezeptor (ER), der ein GRE überhaupt nicht erkennt (Beato, 1989), zur I κ B α -Synthese nicht in der Lage, obwohl beide Rezeptoren die NF- κ B-Aktivität reprimieren können. Die Ergebnisse mit Estradiol bestätigen einen früheren Bericht, wonach die Hemmung der NF- κ B-regulierten Expression des Interleukin (IL)-6-Gens durch Estradiol in Abwesenheit einer verstärkten I κ B α -Synthese erfolgt (Stein und Yang, 1995). Im Gegensatz dazu berichtete vor kurzem eine

andere Arbeitsgruppe, daß eine Dihydrotestosteron (DHT)-vermittelte Repression der IL-6 Genexpression von einem 69% Anstieg der I κ B α -Synthese in LNCaP-Zellen begleitet ist (Keller et al., 1996). Dies stimmt nicht mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten überein, bei denen eine erhöhte I κ B α -Synthese nach DHT-Behandlung derselben Zelllinie nicht beobachtet werden konnte. Der Grund für diese beiden unterschiedlichen experimentellen Ergebnisse ist im Moment nicht klar.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß dissoziierende Glucocorticoid-Analoga, die NF- κ B-regulierte Gene nicht reprimieren, dennoch die I κ B α -Synthese induzierten. Dies zeigt klar, daß eine erhöhte Menge an I κ B α -Protein für die Hemmung der Genexpression NF- κ B-regulierter Gene nicht notwendig ist.

Die Frage nach der biologischen Signifikanz einer Glucocorticoid-induzierten Synthese von I κ B α bleibt bestehen. Momentan fällt es schwer, basierend auf dieser Arbeit, der hormonellen Regulation der I κ B α -Synthese eine biologische Bedeutung zuzuordnen. Obwohl die Daten anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden konnten (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995a), daß Dexamethason die Synthese des I κ B α -Proteins um etwa das 2- bis 3-fache verstärkt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt, daß in Anwesenheit von TNF α über einen Zeitraum von 30 Stunden kein Nettoanstieg der I κ B α -Synthese stattfindet. Unter den gleichen Bedingungen und innerhalb desselben Zeitraums wurde jedoch die NF- κ B-Aktivität durch den GR reprimiert. Diese Daten zeigen, daß eine hormoninduzierte I κ B α -Synthese nicht mit der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Glucocorticoide in Verbindung gebracht werden kann.

Während diese Arbeit durchgeführt wurde, berichtete auch eine andere Arbeitsgruppe, daß Glucocorticoide die NF- κ B-Aktivität in endothelialen Zellen in Abwesenheit einer verstärkten I κ B α -Synthese reprimieren (Brostjan et al., 1996). Diese Untersuchung bestätigt somit die hier dargestellten Daten einer I κ B α -unabhängigen Repression der NF- κ B-Aktivität durch den GR und zeigt, daß diese Ergebnisse auch auf andere Zelltypen übertragen werden können.

4.3.2 Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B

Zusammengenommen machen es die oben diskutierten Daten wahrscheinlich, daß der Mechanismus der NF- κ B-Repression durch Glucocorticoide statt auf einer induzierten I κ B α -Synthese eher auf einer Protein-Protein-Interaktion zwischen dem nicht DNA-gebundenen GR und NF- κ B beruht, wie es auch ursprünglich vorgeschlagen wurde (Ray und Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b). Um die funktionelle Bedeutung dieser Protein-Protein-Interaktion zu klären, war es zunächst nötig, die Bereiche des GR zu identifizieren, die an einer Repression der NF- κ B-Aktivität beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Deletionsmutanten des GR zeigten, daß sowohl die DNA-Bindedomäne (DBD) als auch die Hormon-Bindedomäne (HBD) des GR für

eine funktionelle Repression der NF- κ B-Aktivität erforderlich sind. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So zeigten sowohl Caldenhoven et al. (1995) als auch Scheinman et al. (1995b), daß ein mutierter GR mit deletierter DBD die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B nicht reprimieren kann. Bei den Sequenzen innerhalb der DBD, die für die NF- κ B-Repression notwendig sind, kann es sich jedoch nicht um dieselben handeln, die für eine Rezeptor-Dimerisierung und DNA-Bindung verantwortlich sind, da die dimerisierungsdefekten Gruppe II-Mutanten die NF- κ B-Aktivität noch vollständig reprimierten. Dies bestätigt auch die Vermutung, daß der GR zur Hemmung der NF- κ B-Aktivität nicht an die DNA bindet. Erst kürzlich wurden durch Punktmutationen zwei Aminosäuren im C-terminalen Zinkfinger in der DBD des GR identifiziert, die für die Repression der NF- κ B-Aktivität verantwortlich sein sollen (Liden et al., 1997). Interessanterweise ist der komplette N-Terminus des GR, und somit auch die für die Transaktivierung absolute notwendige Transaktivierungsfunktion AF-1, nicht an der NF- κ B-Repression beteiligt (Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b; diese Arbeit). Die Ergebnisse mit der C-terminalen Deletionsmutante des GR (Caldenhoven et al., 1995; diese Arbeit) sind etwas schwieriger zu interpretieren, da diese Mutante den Bereich zur Hormonbindung nicht mehr enthält. Es ist beschrieben (Hollenberg et al., 1987; Godowski et al., 1988) und auch in dieser Arbeit gezeigt, daß diese Mutante ligandenunabhängig konstitutiv über die AF-1 im N-Terminus zur Transaktivierung in der Lage ist. Würde diese Mutante die für eine NF- κ B-Repression notwendigen Bereiche noch enthalten, so würde man analog dazu zwar keine hormoninduzierte, jedoch eine hormonunabhängige Repression erwarten. Eine konstitutive Repression der TNF α -induzierten Reporter-Gen-Aktivität war im Vergleich zu einer Negativkontrolle jedoch nicht zu beobachten. Der genaue Bereich im C-Terminus des GR, der an der transkriptionellen Repression der NF- κ B-Aktivität beteiligt ist, wurde funktionell nicht näher charakterisiert.

Wie in dieser Arbeit, wurde eine *in vitro* Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Wildtyp-GR und NF- κ B-Untereinheiten auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Ray und Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b). Dabei gab es unterschiedliche Aussagen darüber, ob der GR sowohl mit der transkriptionell aktiven p65- als auch mit der p50-Untereinheit von NF- κ B interagiert. Zumindest für p65 wurde gezeigt, daß es über seine Rel-Homologie-Domäne mit dem GR interagiert (Wissink et al., 1997). In dieser Arbeit konnte eine Interaktion des GR mit beiden Untereinheiten beobachtet werden. Eine Interaktionsstudie von NF- κ B-Untereinheiten mit bereits funktionell charakterisierten Deletionsmutanten des GR wurde in dieser Arbeit erstmals durchgeführt. So konnte ein Bereich im C-Terminus des GR in der Nähe der DBD identifiziert werden, der mit p50 und p65 interagiert. In diesem Bereich überlappen sich offenbar die Sequenzen, die für die Interaktion mit p50 bzw. p65 verantwortlich sind. Ein direkter Vergleich der mit den Deletionsmutanten erhaltenen funktionellen Daten aus den Transfektionsexperimenten mit denjenigen aus den Interaktionsstudien (siehe auch Tab. 4) läßt den Schluß zu, daß eine Interaktion zwischen dem GR und p65 notwendig ist, aber nicht ausreicht, um eine Repression der NF- κ B-Aktivität zu

erreichen. (Eine Interaktion des GR mit p50 scheint dagegen keine Voraussetzung zu sein für die transkriptionelle Interferenz des GR mit der NF- κ B-Aktivität.)

Anhand dieser Daten läßt sich ein Modell postulieren, wonach zunächst der im C-Terminus des GR definierte Bereich den Kontakt mit der p65-Untereinheit herstellt, um beide Proteine in eine räumliche Nähe zueinander zu bringen. Nach dieser physikalischen Interaktion sind dann vermutlich zusätzlich bestimmte Sequenzen in der DBD des GR notwendig (wie beispielsweise die von Liden et al., 1997 definierten), die bewirken, daß es zu einer Störung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B kommt. Man könnte sich vorstellen, daß die direkte Interaktion des GR mit p65 eine "reprimierende" Konformation des Rezeptors induziert, die beispielsweise in der Lage ist, den Kontakt von NF- κ B mit einem Koaktivator oder der basalen Transkriptionsmaschinerie zu unterbinden. Erst kürzlich wurde berichtet, daß CBP/p300 nicht nur ein Koaktivator für AP-1 und den GR ist, sondern auch für p65 (Gerritsen et al., 1997). So wäre es theoretisch möglich, daß der GR, wie es im Falle von AP-1 vorgeschlagen wurde, die NF- κ B-Aktivität durch Konkurrenz um limitierende Mengen des gemeinsamen Koaktivators CBP/p300 reprimiert. Bisher gibt es hierfür jedoch keinerlei Hinweise. Dieser Mechanismus würde auch nicht zwangsläufig eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B involvieren. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß der GR zusätzliche Proteine rekrutiert (nicht notwendigerweise Kofaktoren), die beispielsweise an einer Stabilisierung des GR/NF- κ B-Komplexes oder sogar aktiv an der Hemmung der transkriptionellen NF- κ B-Aktivität beteiligt sind. Künftige Untersuchungen sollten die Beteiligung solcher potentieller Hilfsfaktoren mit einbeziehen.

In Bezug auf einen möglichen Mechanismus der Interferenz des GR mit der NF- κ B-Aktivität wurde weiterhin beschrieben, daß der GR die Bindung von NF- κ B an die DNA verhindert (Ray und Prefontaine, 1994; Scheinman et al., 1995b). Diese Daten beruhen jedoch auf *in vitro* durchgeführten DNA-Bindungsstudien und es ist dringend notwendig, daß diese Daten *in vivo* überprüft werden, um beispielsweise zu klären, ob diesbezüglich ein Unterschied zu dem Mechanismus der AP-1-Repression durch den GR besteht. Im Falle der GR/AP-1-Interferenz wurde aus dem gleichen Grunde lange geglaubt, daß AP-1 durch den GR von der DNA verdrängt wird. Dies hat sich später in *in vivo*-Bindungsstudien jedoch nicht bestätigt. Aufgrund der in 4.1 und 4.2 diskutierten Daten mit dissoziierenden Liganden und GR-Mutanten ist es wahrscheinlicher, daß die Mechanismen, die zu einer AP-1- und zu einer NF- κ B-Repression durch den GR führen, sehr ähnlich sind.

4.4 Physiologische Bedeutung der negativen Genregulation

Basierend auf ihrer Fähigkeit zur physiologischen Regulation der Immunfunktionen des menschlichen Körpers sind Glucocorticoide sehr wirksame anti-inflammatorische und immunsuppressive Substanzen. Ihre sinnvolle therapeutische Anwendung wird jedoch durch schwere Nebenwirkungen begrenzt, die vor allem nach Langzeitanwendung auftreten. Mit einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der anti-inflammatorischen Wirkung

von Glucocorticoiden könnte es möglich sein, die erwünschten und unerwünschten Wirkungen dieser Hormone voneinander zu trennen.

Mechanistisch gesehen wäre möglich, daß diese unterschiedlichen biologischen Wirkungen aus den positiven und negativen Effekten des GR auf die Genexpression resultieren. Folglich ist seit langem das Ziel vieler Untersuchungen, diese beiden Funktionen des GR zu trennen und festzustellen, in welchem Ausmaß sie jeweils an der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden beteiligt sind. Da eine Vielzahl immunregulatorischer Gene durch Glucocorticoide reprimiert wird, nimmt man an, daß die negative genregulatorische Wirkung des GR für die anti-inflammatorischen Effekte dieser Hormone notwendig ist (zur Übersicht siehe auch Cato und Wade, 1996). Trifft dies zu, so wäre es bedeutend zu wissen, ob der GR einen oder verschiedene Mechanismen benutzt, um die Expression dieser Gene zu reprimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Daten erhalten, die dazu beitragen, dem molekularen Verständnis der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden einen Schritt näher zu kommen.

Die Ergebnisse mit Mutanten und synthetischen Liganden des GR haben gezeigt, daß, obwohl offensichtlich zwei unterschiedliche Mechanismen für die Repression von Genen durch den GR existieren (Typ A und Typ B; siehe auch 4.2), der GR vermutlich einen ähnlichen Mechanismus für die Hemmung der Aktivität von AP-1 und NF- κ B benutzt. AP-1 und vor allem NF- κ B sind die wichtigsten Transkriptionsfaktoren bei der positiven Regulation der Expression immunregulatorischer Gene (siehe auch Tab. 1). Es ist noch nicht geklärt, ob die Interferenz zwischen dem GR und anderen Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls an der positiven Kontrolle immunregulatorischer Gene beteiligt sind (z.B. NF-AT, c/EBP β), auch diesem Mechanismus zugeordnet werden kann. Dennoch liefern die hier dargestellten Daten einen Hinweis darauf, daß die Hemmung immunregulatorischer Gene durch den GR (als Basis der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden) nach einem einheitlichen Mechanismus erfolgt. Dieser Mechanismus kann von der transaktivierenden Eigenschaft des GR getrennt werden, was eine wichtige Voraussetzung ist, will man die therapeutische Wirksamkeit von Glucocorticoiden durch Dissoziation dieser Eigenschaften des GR verbessern.

Ein problematischer Punkt in Bezug auf die Zuordnung der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden zu der genreprimierenden Eigenschaft des GR war die Hypothese, daß Glucocorticoide durch Induktion der Transkription des I κ B α -Gens indirekt die Expression NF- κ B-regulierter Gene reprimieren. Dies würde den Versuch extrem erschweren, durch Trennung der genaktivierenden und genreprimierenden Eigenschaften des GR anti-inflammatorisch wirksame Glucocorticoide mit reduzierten Nebenwirkungen zu erhalten. In dieser Arbeit konnte diese Problematik geklärt werden, indem gezeigt wurde, daß die Hemmung NF- κ B-regulierter Gene völlig unabhängig von einer Glucocorticoid-induzierten I κ B α -Synthese ist und auf einem anderen Mechanismus beruht.

Das entscheidendste Resultat dieser Arbeit in Bezug auf eine mögliche Trennung der Glucocorticoid-Wirkungen ergab sich jedoch aus dem Vergleich der genregulatorischen und

anti-inflammatorischen Eigenschaften synthetischer Glucocorticoid-Analoga. Glucocorticoid-Analoga, die im Tiermodell keine anti-inflammatorische Wirkung mehr zeigten, waren auch nicht in der Lage, die Expression NF- κ B- und AP-1-regulierter Gene zu reprimieren. Dies zeigt direkt, daß die Hemmung AP-1 und NF- κ B-regulierter Gene durch den GR mit der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden korreliert. Dieselben synthetischen Analoga vermittelten jedoch die Transaktivierung Glucocorticoid-regulierter Gene, was zeigt, daß die genreprimierende Eigenschaft des GR, und nicht seine genaktivierende, der entscheidende Parameter bei der Vermittlung anti-inflammatorischer Effekte ist. Interessanterweise wurden diese Daten erst kürzlich durch die Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt. Vayssiere et al. (1997) identifizierten in einer umgekehrten Situation synthetische Glucocorticoide, die zur Repression AP-1-regulierter Gene noch vollständig in der Lage waren, aber keine Transaktivierung durch den GR vermitteln konnten. Übereinstimmend mit dem Modell, daß die genreprimierende Eigenschaft des GR mit der anti-inflammatorischen Glucocorticoidwirkung korreliert, haben diese Substanzen ihre anti-inflammatorische Aktivität beibehalten. Es wurde nicht überprüft, ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß sie auch die Expression NF- κ B-regulierter Gene noch hemmen. Im Hinblick auf die Hypothese, daß die unerwünschten Nebenwirkungen einer Glucocorticoid-Therapie von der positiven genregulatorischen Eigenschaft des GR vermittelt werden, könnten solche Substanzen potentiell eine neue Klasse anti-inflammatorischer Glucocorticoide mit reduzierten Nebenwirkungen darstellen.

Die in dieser Arbeit erzielte Trennung der positiven und negativen Wirkungen des GR, sowie die Zuordnung der anti-inflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden zur transkriptionellen Repression durch den GR bildet deshalb eine Basis für weitere Untersuchungen mit dem Ziel, die pharmakologischen Eigenschaften von Glucocorticoiden zu verbessern.

5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	GR	Glucocorticoidrezeptor
AMV	<i>avian myoblastosis virus</i>	GRE	Glucocorticoid <i>responsive</i> Element
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GST	Glutathion-S-Transferase
AP-1	Aktivator-Protein 1	h	Stunde
AR	Androgenrezeptor	HBD	Hormon-Bindedomäne
AS	Aminosäuren	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	hGR	menschlicher Glucocorticoidrezeptor
bp	Basenpaare	HIV	menschliches Immunschwäche Virus
BSA	Rinderserumalbumin	Hsp	Hitzeschockprotein
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase	ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
CBP	CREB-Bindeprotein	IL	Interleukin
CCS	mit Aktivkohle behandeltes FCS (<i>charcoal calf serum</i>)	I κ B	Inhibitor von NF- κ B
cDNA	zur RNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNA	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
cm	Zentimeter	KAc	Kaliumacetat
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)	kb	Kilobasen (1000 Basen)
CREB	cAMP <i>responsive</i> Element Bindeprotein	kDa	Kilodalton
C-Terminus	Carboxy-Terminus	l	Liter
dATP	2'-Deoxyadenosintriphosphat (analog: dCTP, dGTP, dTTP)	LPS	Lipopolysaccharide
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-triphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP)	LTR	<i>long terminal repeat</i>
DBD	DNA-Bindedomäne	M	molar
Dex	Dexamethason	mA	Milliampère
DEAE	Diethylaminoethyl	MBq	Megabequerel
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mg	Milligramm
DHT	Dihydrotestosteron	μ g	Mikrogramm
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium	min	Minuten
DMSO	Dimethylsulfoxid	mM	millimolar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
DTT	Dithiothreitol	MOPS	N-Morpholino-propansulfonsäure
E	Extinktion	MR	Mineralocorticoidrezeptor
E ₂	17 β -Estradiol	mRNA	Boten-RNA
E ₂₆₀ , E ₂₈₀	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm	MTIIa	Metallothionein IIa
ECL	<i>enhanced</i> Chemolumineszenz	Na-Acetat	Natriumacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NF- κ B	Nuklearer Faktor- κ B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ng	Nanogramm
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Amino-ethylether)-Tetraessigsäure	nGRE	negatives GRE
ER	Estrogenrezeptor	nm	Nanometer
FCS	Fötales Kälberserum	nt	Nukleotide
g	Gramm	NP-40	Nonidet P-40
g	Erdbeschleunigung	N-Terminus	Amino-Terminus
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
		PCR	Polymerasekettenreaktion
		pmol	Pikomol
		PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid

Abkürzungen

PR	Progesteronrezeptor	TNF α	Tumor Nekrosis Faktor α
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol- 13-acetat
rGR	Ratten-Glucocorticoidrezeptor	TRE	TPA- <i>response</i> -element
RNA	Ribonukleinsäure	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
RNase	Ribonuklease	tRNA	Transfer-RNA
RNasin	RNase Inhibitor	U	Enzymeinheiten (Units)
rNTPs	Ribonukleosidtriphosphate	UV	Ultraviolette Strahlung
RSV	Rous Sarkoma Virus	V	Volt
SDS	Natriumdodecylsulphat	v/v	Volumen pro Volumen
sec	Sekunden	wt	Wildtyp
TAT	Tyrosin-Aminotransferase	w/v	Masse pro Volumen
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin		
tk	Thymidin Kinase		

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

6 Literatur

- Adler, A.J., Danielsen, M. & Robins, D.M. (1992). Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11660-11663.
- Adler, A.J., Scheller, A., Hoffman, Y. & Robins, D.M. (1991). Multiple components of a complex androgen-dependent enhancer. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1587-1596.
- Allan, G.F., Leng, X., Tsai, S.Y., Weigel, N.L., Edwards, D.P., Tsai, M.-J. & O'Malley, B.W. (1992). Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 19513-19520.
- Allan, G.F., Lombardi, E., Haynes-Johnson, D., Palmer, S., Kiddoe, M., Kraft, P., Campen, C., Rybczynski, P., Combs, D.W. & Phillips, A. (1996). Induction of a novel conformation in the progesterone receptor by ZK299 involves a defined region of the carboxyl-terminal tail. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1206-1213.
- Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Jung, S., Avraham, A., Gerlitz, O., Pashut-Lavon, I. & Ben-Neriah, Y. (1995). In vivo stimulation of I κ B phosphorylation is not sufficient to activate NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1294-1301.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. & 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**, 2256-2266.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739.
- Angel, P. & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. & Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**, 226-229.
- Auphan, N., Di Donato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A. & Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* **270**, 286-290.
- Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. (1996). NF- κ B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643.
- Barnes, P.J. & Adcock, I. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 436-441.
- Baxter, J.D. & Forsham, P.H. (1972). Tissue effects of glucocorticoids. *Am. J. Med.* **53**, 573-589
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.
- Beato, M., Herrlich, P. & Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.

- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T. & Baltimore, D. (1995). Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes & Dev.* **9**, 2736-2746.
- Beg, A.A. & Baldwin, A.S.Jr. (1993). The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes & Dev.* **7**, 2064-2070.
- Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P.V. & Baldwin, A.S.Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B- α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3301-3310.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A. & Baldwin, A.S.Jr. (1992). I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes & Dev.* **6**, 1899-1913.
- Blalock, J.E. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* **15**, 504-510.
- Boumpas, D.T. (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* **119**, 1198-1208.
- Brostjan, C., Anrather, J., Cszimadia, V., Stroka, D., Soares, M., Bach, F.H. & Winkler, H. (1996). Glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 19612-19616.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G. & Siebenlist, U. (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2532-2536.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A. & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758.
- Cairns, C., Cairns, W. & Okret, S. (1993). Inhibition of gene expression by steroid hormone receptors via a negative glucocorticoid response element: evidence for the involvement of DNA-binding and agonistic effects of the antiglucocorticoid/antiprogesterin RU486. *DNA and Cell Biol.* **12**, 695-702.
- Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., van de Stolpe, A., Raaijmakers, J., Koenderman, L., Okret, S., Gustafsson, J.-Å. & van der Saag, P.T. (1995). Negative cross-talk between Rel A and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **9**, 401-412.
- Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P.-E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J.-A. & Jörnvall, 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**, 6842-6846.
- Cato, A.C.B., Skroch, P., Weinmann, J., Butkeraitis, P. & Ponta, H. (1988). DNA sequences outside the receptor-binding sites differently modulate the responsiveness of the mouse mammary tumour virus promoter to various steroid hormones. *EMBO J.* **7**, 1403-1410.
- Cato, A.C.B. & Ponta, H. (1989). Different regions of the estrogen receptor are required for synergistic action with the glucocorticoid and progesterone receptors. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5324-5330.
- Cato, A.C.B., Ponta, H. & Herrlich, P. (1992a). Regulation of gene expression by steroid hormones. *Prog. Nuc. Acid Mol. Biol.* **43**, 1-36.

- Cato, A.C.B., König, H., Ponta, H. & Herrlich, P. (1992b). Steroids and growth promoting factors in the regulation of expression of genes and gene networks. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43**, 63-68.
- Cato, A.C.B. & Wade, E. (1996). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BioEssays* **18**, 371-378.
- Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M. & Evans, R.M. (1996). Role of CBP/p300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99-103.
- Chen, J.Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J.E., Reczek, P., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1995). RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP-1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.* **14**, 1187-1197.
- Chiu, R., Angel, P. & Karin, M. (1989). JunB differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**, 979-986.
- Cippitelli, M., Sica, A., Viggiano, V., Ye, J., Ghosh, P., Birrer, M.J. & Young, H.A. (1995). Negative transcriptional regulation of the interferon- γ promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-jun. *J. Biol. Chem.* **270**, 12548-12556.
- Claessens, F., Alen, P., Devos, A., Peeters, B., Verhoeven, G. & Rombauts, W. (1996). The androgen-specific probasin response element 2 interacts differently with androgen and glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 19013-19016.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. & Schütz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Dev.* **9**, 1608-1621.
- Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F. & Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9991-9995.
- Cutroneo, K.R., Sterling, K.M. & Shull, S. (1986). Steroid hormone regulation of extracellular matrix proteins. In *Regulation of Matrix Accumulation*. Mecham, R.P. (ed.), Academic Press, London, 119-176.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.-A. & 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**, 3107-3112.
- Dahlman-Wright, K., Almlöf, T., McEwan, I.J., Gustafsson, J.-A. & Wright, A.P.H. (1994). Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1619-1623.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. & Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* **11**, 1025-1033.
- Deng, T. & Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes & Dev.* **7**, 479-490.

- Denis, M., Poellinger, L., Wikström, A.-C. & Gustafsson, J.-A. (1988). Requirement of hormone for thermal conversion of the glucocorticoid receptor to a DNA-binding state. *Nature* **333**, 686-688.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., de Luca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S. (1987). Firefly Luciferase Gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 725-737.
- Diamond, M., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. & Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**, 1266-1272.
- Dittmar, K.D., Demady, D.R., Stancato, L.F., Krishna, P. & Pratt, W.B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **272**, 21213-21220.
- Drouin, J., Trifiro, M.A., Plante, R.K., Nemer, M., Eriksson, P. & Wrangé, Ö. (1989). Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5305-5314.
- Eriksson, P. & Wrangé, Ö. (1990). Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. *J. Biol. Chem.* **265**, 3535-3542.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Fanjul, A., Dawson, M.I., Hobbs, P.D., Jong, L., Cameron, J.F., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X.P. & Pfahl, M. (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* **372**, 107-111.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, **132**, 6-13.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouly, S., Dani, C., Jeanteur, P. & Blanchard, J.M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1431-1442.
- Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B. & Yamamoto, K.R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334**, 543-546.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. & Collins, T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2927-2932.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. & Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652.
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Rev.* **15**, 391-407.
- Godowski, P.J., Picard, D. & Yamamoto, K.R. (1988). Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-lex fusion proteins. *Science* **241**, 812-816.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. & Howard, B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051.
- Graham, R. & van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of the human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.

- Green, S. & Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends in Genetics* **4**, 309-314.
- Grimm, S. & Baeuerle, P.A. (1993). The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* **290**, 297-308.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of *E. coli*. In *DNA cloning*. D.M. Glover (ed.). IRL Press, Oxford, **1**, 109-135.
- Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J.-A. & Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **249**, 157-160.
- Härtig, E., Nierlich, B., Mink, S., Nebl, G. & Cato, A.C.B. (1993). Regulation of expression of mouse mammary tumor virus through sequences located in the hormone response element: involvement of cell-cell-contact and a negative regulatory factor. *J. Virol.* **67**, 813-821.
- Heck, S. (1993). An der Repression der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligte Bereiche des Glucocorticoidrezeptors. Diplomarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. & Cato, A.C.B. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* **13**, 4087-4095.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Göttlicher, M., Herrlich, P. & Cato, A.C.B. (1997). I κ B α independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **16**, 4698-4707.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-736.
- Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C. & Karin, M. (1995). Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **14**, 452-460.
- Hench, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H. & Polley, H.F. (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis: preliminary report. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.* **24**, 181-197.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hollenberg, S.M. & Evans, R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **55**, 899-906.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P. & Evans, R. (1987). Colocalisation of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* **49**, 39-46.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Jhonson, D.L. & Stallcup, M.R. (1996). GRIP-1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4948-4952.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richter, J.K., Takimoto, G.S. & Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1167-1177.

- Howard, K. & Distelhorst, C.W. (1988). Evidence for intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 3474-3481.
- Israël, N., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Aillet, F. & Virelizier, J.-L. (1992). Redox status of cells influences constitutive or induced NF- κ B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J. Immunol.* **149**, 3386-3393.
- Ito, C.Y., Kazantsev, A.G. & Baldwin, A.S.Jr. (1994). Three NF- κ B sites in the I κ B- α promoter are required for induction of gene expression by TNF α . *Nucleic Acids Res.* **22**, 3787-3792.
- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L. & Horwitz, K.B. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocrinol.* **11**, 693-704.
- Jantzen, H.-M., Strähle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R. & Schütz, G. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* **49**, 29-38.
- Jonat, C. (1990). Glucocorticoid-induzierte Repression der Kollagenase-I Synthese: Vermittlung durch den Transkriptionsfaktor AP-1. Doktorarbeit an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. & Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204.
- Kalkhoven, E., Wissink, S., van der Saag, P.T. & van der Burg, B. (1996). Negative interaction between the Rel(p65) subunit of NF- κ B and the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* **271** 6217-6224.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Sheng-Cai, L., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414.
- Karin, M. & Richards, R.I. (1982). Human metallothionein genes: molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3165-3173.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M. & Beato, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIa gene. *Nature* **308**, 513-519.
- Kaspar, F., Klocker, H., Denninger, A. & Cato, A.C.B. (1993). A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: identification of the function of a conserved alanine residue in the D-box of steroid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7850-7858.
- Kawai, S. & Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1172-1174.
- Keller, E.T., Chang, C. & Ershler, W.B. (1996). Inhibition of NF- κ B activity through maintenance of I κ B α levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the Interleukin-6 promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 26267-26275.
- Kerppola, T.K., Luk, D. & Curran, T. (1993). Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3782-3791.
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. (1992). Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* **11**, 2241-2246.

- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R. & Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**, 223-226.
- Laemmli, U.D. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R. & Israël, A. (1993). Promoter analysis of the gene encoding the I κ B- α /MAD3 inhibitor of NF- κ B: positive regulation by members of the rel/NF- κ B family. *EMBO J.* **12**, 5043-5049.
- Lee, W., Mitchell, P. & Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741-752.
- Lee, S.W., Tsou, A-P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E.M. & Allison, A.C. (1988). Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1204-1208.
- Liden, J., Delaunay, F., Rafter, I., Gustafsson, J.-A. & Okret, S. (1997). A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 21467-21472.
- Lin, Y.-C., Brown, K. & Siebenlist, U. (1995). Activation of NF- κ B requires proteolysis of the inhibitor I κ B- α : signal induced phosphorylation of I κ B- α alone does not release active NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 552-556.
- Liou, H.C. & Baltimore, D. (1993). Regulation of the NF- κ B/Rel transcription factor and I κ B inhibitor system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 477-487.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randell, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lucibello, F.C., Slater, E.P., Jooss, K.U., Beato, M. & Müller, R. (1990). Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in Fos B. *EMBO J.* **9**, 2827-2834.
- Malkoski, S.P., Handanos, C.M. & Dorin, R.I. (1997). Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **127**, 189-199.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.J., Hopp, T.P. & Cosman, D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**, 641-647.
- McEwan, I.J., Wright, A.P.H. & Gustafsson, J.-A. (1996). Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bio Assays* **19**, 153-160.
- Meyer, T., Starr, D.B. & Carlstedt-Duke, J. (1997). The rat glucocorticoid receptor mutant K461A differentiates between two different mechanisms of transrepression. *J. Biol. Chem.* **272**, 21090-21095.
- Miner, J.N., Diamond, M.I. & Yamamoto, K.R. (1991). Joints in the regulatory lattice: composite regulation by steroid receptor-AP1 complexes. *Cell Growth Differ.* **2**, 525-530.

- Miner, J.N. & Yamamoto, K.R. (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev.* **6**, 2491-2501.
- Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomszyk, K., Lobb, R. & Harlan, J.M. (1991). Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6523-6527.
- Mordacq, J.C. & Linzer, D.I.H. (1989). Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* **3**, 760-769.
- Morgenstern, J.P. & Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3587-3596.
- Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T. & Matsushima, K. (1994). Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. *J. Biol. Chem.* **269**, 13289-13295.
- Munck, A., Guyre, P.M. & Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* **5**, 25-44.
- Munck, A. & Náray-Fejes-Tóth, A. (1995). Glucocorticoid action. In *Endocrinology*, Vol.2. De Groot, L.J. (ed.). W.B. Saunders, Philadelphia, 1642-1656.
- Nordeen, S.K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* **6**, 454-458.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. & Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.
- Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J. & O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.
- Paliogianni, F., Raptis, A., Ahuja, S.S., Najjar, S.M. & Boumpas, D.T. (1993). Negative transcriptional regulation of human interleukin-2 (IL-2) gene by glucocorticoids through the interference of nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J. Clin. Invest.* **91**, 1481-1489.
- Pearce, D. & Yamamoto, K.R. (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* **259**, 1161-1164.
- Picard, D. & Yamamoto, K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6**, 3333-3340.
- Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N.E. & 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. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 1020-1024.
- Pratt, W.B., Jolly, D.J., Pratt, D.V., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F.M., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M.-G., Evans, R.M. & Baulieu, E.-E. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.* **263**, 267-273.
- 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**, 21455-21458.
- Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., König, H., Krämer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H.J., Cato, A.C.B., Angel, P. & Herrlich, P.

- (1993). The activation and activity control of AP-1 (Fos/Jun). *Annals N.Y. Acad. Sci.* **684**, 127-148.
- Radomski, N.W., Palmer, R.M. & Moncada, S. (1990). Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 10043-10047.
- Ray, A., LaForge, K.S. & Sehgal, P.B. (1990). On the mechanism for the efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5736-5746.
- Ray, A. & Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 752-756.
- Reik, A., Stewart, A.F. & Schütz, G. (1994). Cross-talk modulation of signal transduction pathways: two mechanisms are involved in the control of tyrosine aminotransferase gene expression by phorbol esters. *Mol. Endocrinol.* **8**, 490-497.
- Saatcioglu, F., Claret, F.-X. & Karin, M. (1994). Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 347-359.
- Sakai, D.D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A., Rottman, F.M. & Yamamoto, K.R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* **2**, 1144-1154.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Scheidereit, C., von der Ahe, D., Cato, A.C.B., Wenz, M., Suske, G., Carlson, C., Bosshard, H., Westphal, H.M. & Beato, M. (1989). Protein-DNA interactions at steroid hormone regulated genes. *Endocrine Res.* **15**, 417-440.
- Scheinman R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K. & Baldwin, A.S.Jr. (1995a). Role of transcriptional activation of I κ B- α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283-286.
- Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowsky, J.A. & Baldwin, A.S.Jr. (1995b). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 943-953.
- Schena, M., Freedman, L.P. & Yamamoto, K.R. (1989). Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Devel.* **3**, 1590-1601.
- Scherer, G., Schmid, W., Strange, C.M., Röwekamp, W. & Schütz, G. (1982). Isolation of cDNA clones coding for rat tyrosin aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7205-7208.
- Schüle, R., Müller, M., Kaltschmidt, C. & Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* **242**, 1418-1420.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Kliwer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M. & Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226.
- Schwiebert, L.M., Schleimer, R.P., Radka, S.F. & Ono, S.J. (1995). Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell. Immunol.* **165**, 12-19.
- Shirakawa, F., Saito, K., Bonagura, C.A., Galson, D.L., Fenton, M.J., Webb, A.C. & Auron, P.E. (1993). The human prointerleukin 1 β gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1332-1344.

- Smith, C.L., Oñate, S.A., Tsai, M.-J. & 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. USA* **93**, 8884-8888.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. & O'Malley, B.W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* **11**, 657-666.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J. & O'Malley, B.B. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194-198.
- Starr, D.B., Matsui, W., Thomas, J.R. & Yamamoto, K.R. (1996). Intracellular receptors use a common mechanism to interpret signaling information at response elements. *Genes & Dev.* **10**, 1271-1283.
- Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M. & Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5169-5181.
- Stein, B., Baldwin, A.S.Jr., Ballard, D.W., Greene, W.C., Angel, P. & Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* **12**, 3879-3891.
- Stein, B. & Yang, M.X. (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4971-4979.
- Strähle, U., Schmid, W. & Schütz, G. (1988). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* **7**, 3389-3395.
- Strömstedt, P.-E., Poellinger, L., Gustafsson, J.-A. & 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**, 3379-3383.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Subramaniam, N., Cairns, W. & 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**, 153-163.
- Sun, S.-C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W. & Greene, W.C. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1912-1915.
- Teurich, S. & Angel, P. (1995). The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem. Senses* **20**, 251-255.
- Thanos, D. & Maniatis, T. (1995). NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* **80**, 529-532.
- Tonelli, G., Thibault, L. & Ringler, I. (1965). A bioassay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thymolytic activities of topically applied corticoids. *Endocrinology* **77**, 625.
- Töpert, A. (1988). Perspectives in corticosteroid research. *Drugs* **36** (Suppl. 5), 1-8.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**, 677-684.

- Touray, M., Ryan, F., Jaggi, R. & Martin, F. (1991). Characterization of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* **6**, 1227-1234.
- Tsai, M.-J. & O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Rev. Biochem.* **63**, 451-486.
- Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W.R., Webb, A.C. & Auron, P.E. (1994). Transcription factor NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 β gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7285-7297.
- Umesono, K. & Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139-1146.
- Vacca, A., Felli, M.P., Farina, A.R., Martinotti, S., Maroder, M., Screpanti, I., Meco, D., Petrangeli, E., Frati, L. & Gulino, A. (1992). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J. Exp. Med.* **175**, 637-646.
- van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Raaijmakers, J.A.M., van der Saag, P.T. & Koenderman, L. (1993). Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **8**, 340-347.
- van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A.M., Johnson, J.P. & van der Saag, P.T. (1995). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat- and tumor necrosis factor α -mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethason. *J. Biol. Chem.* **269**, 6185-6192.
- Vayssiere, B.M., Dupont, S., Choquart, A., Petit, F., Garcia, T., Marchandea, C., Gronemeyer, H. & Resche-Rigon, M. (1997). Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity *in vivo*. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1245-1255.
- Verma, I.M., Stevenson, J.-K., Schwarz, E.M., van Antwerp, D. & Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Dev.* **9**, 2723-2735.
- Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Zechel, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1996). TIF-2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 3667-3675.
- von der Ahe, D., Janich, S., Scheidreit, C., Renkawitz, R., Schütz, G. & Beato, M. (1985). Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* **313**, 706-709.
- von Knebel-Doeberitz, M., Koch, S., Drzonek, H. & Zur Hausen, H. (1990). Glucocorticoid hormones reduce the expression of major histocompatibility class I antigens on human epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **20**, 35-40.
- Voraberger, G., Schäfer, R. & Stratowa, C. (1991). Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. *J. Immunol.* **147**, 2777-2786.
- Wade, E.J., Heck, S. & Cato, A.C.B. (1995). Glucocorticoid receptor-activator protein-I interactions in drug design. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 946-952.
- Wade, P.A. & Wolffe, A.P. (1997). Chromatin: histone acetyltransferases in control. *Curr. Biol.* **7**, 82-84.

- Webster, N.J.G., Green, S., Jin, J.R. & Chambon, P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* **54**, 199-207.
- Wehle, H., Moll, J. & Cato, A.C.B. (1995). Molecular identification of steroid analogs with dissociated antiprogesterin activities. *Steroids* **60**, 368-374.
- Westley, B. & Rocheford, H. (1980). Secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* **20**, 353-360.
- Wissink, S., van Heerde, E.C., Schmitz, M.L., Kalkhoven, E., van der Burg, B., Baeuerle, P.A. & van der Saag, P.T. (1997). Distinct domains of the RelA NF- κ B subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 22278-22284.
- Wrange, Ö., Eriksson, P. & Perlmann, T. (1989). The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J. Biol. Chem.* **264**, 5253-5259.
- Xie, Q.-W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708.
- Yang-Yen, H-F., Chambard, J-C., Sun, Y-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. & Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**, 1205-1215.
- Zeiner, M. & Gehring, U. (1995). A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11465-11469.
- Zentel, H.J. & Töpert, M. (1994). Preclinical evaluation of a new topical corticosteroid methylprednisolone aceponate. *J. Europ. Acad. Derm. Ven.* **3** (Suppl. 1), 32-38.
- Zhang, X.-K., Dong, J.-M. & Chiu, J.-F. (1991a). Regulation of α -fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site. *J. Biol. Chem.* **266**, 8248-8254.
- Zhang, X.-K., Wills, K.N., Husmann, T. & Pfahl, M. (1991b). Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6016-6025.
- Zilliaccus, J., Wright, A.P.H., Carlstedt-Duke, J. & Gustafsson, J.-A. (1995). Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol. Endocrinol.* **9**, 389-400.