

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6187

**Signaltransduktion durch den
Androgenrezeptor: genomische
und nicht-genomische Wirkungen
von Androgenen und
Antiandrogenen**

H. Peterziel
Institut für Genetik

Januar 1999

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6187

**Signaltransduktion durch den Androgenrezeptor:
genomische und nicht-genomische Wirkungen von
Androgenen und Antiandrogenen**

Heike Peterziel

Institut für Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1999

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

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

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

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Androgene, die männlichen Sexualhormone, sind notwendig für die normale körperliche Entwicklung des Mannes und dienen der Ausbildung und Aufrechterhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Andererseits wird durch die anhaltende Verfügbarkeit von Androgenen nicht nur Wachstum und Differenzierung der normalen sondern auch der pathophysiologisch veränderten Prostata stimuliert. Androgenentzug ist deshalb die Standardtherapie bei fortgeschrittenem Prostatakrebs.

Die Wirkungen von Androgenen werden durch den Androgenrezeptor (AR) vermittelt, welcher nach Ligandenbindung als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen positiv und negativ reguliert. Die Transaktivierung durch den AR kann durch Antiandrogene gehemmt werden, die mit dem physiologischen Hormon um die Bindung an den Rezeptor konkurrieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die genregulatorischen Eigenschaften zweier Androgenrezeptormutanten mit Austausch von Valin zu Methionin in der Hormonbindedomäne des AR (AR V715M und AR V730M) in Gegenwart der Antiandrogene Hydroxyflutamid und Casodex mit derjenigen des Wildtyp-AR verglichen. Es zeigte sich, daß beide mutierte Rezeptoren ein signifikant höheres Transaktivierungspotential gegenüber diesen Antiandrogenen besaßen als der Wildtyp-AR. In der Fähigkeit zur Repression, hier untersucht am Beispiel des Collagenase I-Promotors, gab es jedoch keine Unterschiede. Alle Rezeptoren waren in Anwesenheit von Casodex und Hydroxyflutamid in Konzentrationen über 1 μ M zur Transrepression des verwendeten Collagenase I-Reportergens fähig. Die Antiandrogene wirkten bei der negativen Regulation durch den AR also als Agonisten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine weitere Funktion des Androgenrezeptors beschrieben, es wurde gezeigt, daß er als Vermittler nicht-genomischer Signale wirken kann. Androgenbehandlung AR-positiver Prostatazellen führte zu intrazellulären Calciumoszillationen und zu einer mehrphasigen Induktion der Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK 1 und ERK 2. Mit Hilfe einer kernlokalisationsdefekten AR-Mutante konnte gezeigt werden, daß es sich bei der schnellen ERK-Phosphorylierung innerhalb von Minuten um einen cytoplasmatischen Effekt des AR handelt, während die spätere Aktivierung nach mehreren Stunden vermutlich auf einer genomischen Funktion des AR beruht. Die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 ist korreliert mit der transkriptionellen Aktivierung des *ternary complex factor* Elk-1 und des Protoonkogens c-fos. Der cytoplasmatische AR-Signaltransduktionsweg wurde mit Hilfe verschiedener Proteinkinaseinhibitoren und dominant-negativer Kinasen analysiert. Dabei zeigte es sich, daß der AR vermutlich über einen Phosphatidylinositol 3-Kinase und Proteinkinase C einschließenden Weg zur Aktivierung der Raf-MEK-MAPK-Signalkaskade führt.

Da Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionswegs mit einer verstärkten Zellproliferation in Zusammenhang gebracht wird und auch der antiandrogen-beladene AR die Aktivierung vermitteln kann, bildet diese Androgenwirkung möglicherweise die Basis für die wachstumsfördernde Wirkung des AR und eine Erklärung für das Scheitern der Antiandrogentherapie.

Signal transduction through the androgen receptor: genomic and non-genomic actions of androgens and antiandrogens

Summary

Androgens, the male sexual hormones are indispensable for normal developmental control, and for the maintenance of the male phenotype. At the same time the continuous availability of androgens leads to growth and differentiation as well as neoplastic transformation of the prostate. The standard therapy for advanced prostate cancer therefore consists of complete androgen withdrawal.

The functions of androgens are mediated by the androgen receptor (AR) which upon ligand binding acquires the ability to positively or negatively regulate the expression of specific target genes. Positive regulation of gene expression by the AR can be blocked by antiandrogens which compete with the physiological hormone for binding to the receptor.

In the first part of this work, the ability to regulate gene expression of two AR mutants with amino acid exchanges from valine to methionine in the hormone binding domain (AR V715M and AR V730M) in the presence of the two antiandrogens hydroxyflutamide and casodex was compared with that of the wild-type AR. Both mutant receptors showed a significantly higher transactivation potential in the presence of these antiandrogens than the wild-type AR. Their ability to repress expression at the collagenase-I promoter however was not altered. The receptors analysed were all able to repress the activity of a collagenase-I reporter gene in the presence of casodex and hydroxyflutamide at concentrations higher than 1 mM. This means the antiandrogens functioned as agonists of the negative regulation by the AR.

In the second part of this work, a novel function of the AR was described. The AR was shown to function as a mediator of non-genomic signals. Treatment of AR-positive prostate cancer cells resulted in oscillations of the intracellular calcium concentration and a multiple induction of phosphorylation of the mitogen-activated kinases (MAPK) ERK 1 and ERK 2. The rapid ERK phosphorylation within minutes appeared to be a cytoplasmic effect of the AR, whereas the late activation that occurred after a few hours was apparently due to a genomic AR function. The phosphorylation of ERK 1 and 2 correlated with the transcriptional activation of the ternary complex factor Elk-1 and the c-fos protooncogene. This cytoplasmic signal transduction mediated by the AR was further analysed with the use of different protein kinase inhibitors and dominant-negative kinase mutants. The results suggested that the AR activates the Raf-MEK-MAPK signalling cascade through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein kinase C.

As the activation of the MAPK signal transduction pathway is connected with an increase in cell proliferation, the antiandrogen-mediated ERK-activation through the AR, may form the basis for the growth-promoting effect of the AR in the presence of the antihormones and thus provide an explanation for the failure of the antiandrogen therapy.

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Physiologische Bedeutung der Androgene während der Embryonalentwicklung des Menschen..... | 1 |
| 1.2 Die kontinuierliche wachstumsfördernde Wirkung von Androgenen führt zu pathophysiologischen Veränderungen der Prostata..... | 2 |
| 1.2.1 Androgenentzug als Prostatakrebstherapie..... | 2 |
| 1.3 Struktur und Wirkungsweise des Androgenrezeptors..... | 5 |
| 1.3.1 Bedeutung von Mutationen im Androgenrezeptorgen bei therapieresistenten Prostatatumoren..... | 5 |
| 1.4 Klassische Funktionen des Androgenrezeptors - Transaktivierung und Transrepression..... | 10 |
| 1.4.1 Transaktivierung durch den Androgenrezeptor..... | 11 |
| 1.4.2 Transrepression durch den Androgenrezeptor..... | 12 |
| 1.4.2.1 Repression von Genen durch Androgenrezeptor-DNA-Interaktion..... | 12 |
| 1.4.2.2 Protein-Protein-Interaktion als Mechanismus der negativen Genregulation durch den Androgenrezeptor..... | 13 |
| 1.5 Interaktion zwischen Androgenrezeptor und Signaltransduktionswegen..... | 13 |
| 1.6 Nicht-genomische Wirkungen von Androgenen..... | 14 |
| 1.7 Fragestellung..... | 15 |
| | |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| | |
| Material | |
| 2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| Radiochemikalien..... | 19 |
| Enzyme..... | 19 |
| 2.2 Plasmidkonstrukte..... | 20 |
| Reporter-gen-Plasmide für transiente Transfektionen..... | 20 |
| Expressionsplasmide für transiente Transfektionen..... | 20 |
| Androgenrezeptor-Expressionsplasmide für stabile Transfektionen..... | 20 |
| 2.3 Sonden für RNA-Hybridisierungen..... | 21 |

| | | |
|-----|---|----|
| 2.4 | Antikörper..... | 22 |
| 2.5 | Bakterien und eukaryontische Zellen | 23 |
| | Bakterienstamm für Klonierungen | 23 |
| | Zellen und Kulturbedingungen | 23 |
| | Zelllinien | 23 |
| | Primäre Zellen | 24 |

Methoden

| | | |
|------|--|----|
| 2.6 | Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren..... | 25 |
| | Extraktion von Nukleinsäuren..... | 25 |
| | Fällung von Nukleinsäuren | 25 |
| | Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 25 |
| 2.7 | DNA-Klonierungstechniken | 26 |
| | Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen | 26 |
| | Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese..... | 26 |
| | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 26 |
| | Präparation von Vektoren für die Subklonierung | 27 |
| | Dephosphorylieren von 5'DNA-Überhängen mit CIP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)..... | 27 |
| | Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren..... | 27 |
| | Präparation von kompetenten Bakterien für die Transformation (nach Hanahan, 1986)..... | 28 |
| | Transformation von Bakterien (nach Hanahan, 1986)..... | 28 |
| 2.8 | Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien..... | 28 |
| | Plasmid-DNA-Präparation in kleinem Maßstab ("Minipräp") | 28 |
| | Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab ("Maxipräp") | 29 |
| 2.9 | Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte | 29 |
| | Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977) | 29 |
| | Auftrennung der Sequenzierreaktionen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 30 |
| 2.10 | Radioaktive Markierung und Reinigung von Sonden für RNA-Hybridisierungen | 31 |
| | Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten..... | 31 |
| | Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten durch Gelfiltration..... | 31 |
| 2.11 | Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen..... | 32 |
| | Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951) | 32 |
| | Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) | 32 |
| | Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.12 Zellkultur..... | 33 |
| Passagieren von Zellen | 33 |
| Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 34 |
| Herstellung von CCS (<i>charcoal calf serum</i> , nach Westley und Rochefort, 1980)..... | 34 |
| 2.13 Messung der freien cytosolischen Calciumkonzentration | 34 |
| Vorbehandlung der Zellen..... | 34 |
| Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 | 35 |
| Analyse der Induktorwirkung und Verarbeitung des Fluoreszenzsignals | 35 |
| 2.14 Transiente Transfektionen | 35 |
| Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (nach Graham und van der Eb, 1973)..... | 35 |
| Elektroporation für den Androgenrezeptor-Immunnachweis (Eul et al., 1989) | 36 |
| 2.15 Stabile Transfektionen..... | 36 |
| 2.16 Analyse der Genexpression durch den Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivitätstest (Gorman et al., 1982) | 37 |
| Präparation von Proteinextrakten für CAT-Analysen..... | 37 |
| CAT-Aktivitätstest | 37 |
| 2.17 Analyse der Genexpression durch den Luciferaseaktivitätstest (nach de Wet et al., 1987) | 38 |
| Präparation von Proteinextrakten für Luciferase-Analysen | 38 |
| Luciferaseaktivitätstest..... | 38 |
| 2.18 Analyse von RNA durch Transfer auf Membranen und Detektion durch radioaktiv markierte DNA-Fragmente (<i>Northern blot</i>)..... | 39 |
| Präparation von poly A ⁺ RNA aus Zellen | 39 |
| Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese..... | 40 |
| <i>Northern blot</i> und Hybridisierung | 40 |
| 2.19 Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (<i>Western blot</i>) | 41 |
| Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den <i>Western blot</i> | 41 |
| <i>Western blot</i> und Detektion von Proteinen auf Membranen..... | 42 |
| 2.20 Immunfluoreszenznachweis des Androgenrezeptorproteins..... | 43 |
| Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung der Zellen | 43 |
| 2.21 <i>In vitro</i> Immunkomplex-Kinasetest mit Myelin-basischem Protein | 43 |
| Herstellen der Na ₃ VO ₄ -Stammlösung (Krypta et al., 1988) | 43 |
| Immunpräzipitation der Proteine ERK 1 und ERK 2 | 44 |
| <i>In vitro</i> Kinasetest..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 3 Ergebnisse | 45 |
| 3.1 Mutationen in der Hormonbindedomäne bewirken die Induzierbarkeit des Androgenrezeptors durch Antiandrogene..... | 46 |
| 3.1.1 Zwei Mutationen in der Hormonbindedomäne führen zu einem erhöhten Transaktivierungspotential des Androgenrezeptors in Gegenwart von Antiandrogenen..... | 47 |
| 3.1.2 Wildtyp- und mutierte Androgenrezeptoren hemmen die Aktivität eines Collagenase I-Reporters in Anwesenheit von Androgen und Antiandrogenen | 49 |
| 3.2 Einfluß von Androgenen auf zelluläre Signaltransduktionswege..... | 54 |
| 3.2.1 Die dihydrotestosteron-induzierte Erhöhung von freiem cytosolischem Calcium ist abhängig von der Anwesenheit des Androgenrezeptors | 54 |
| 3.2.2 Dihydrotestosteron führt zu einer zelltypspezifischen Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2..... | 57 |
| 3.2.3 Die Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK 1 und ERK 2 durch den Androgenrezeptor ist subtypspezifisch | 61 |
| 3.2.4 Funktionelle Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 durch Dihydrotestosteron..... | 65 |
| 3.2.5 Antiandrogene wirken als Agonisten bei der Androgenrezeptor- vermittelten ERK-Aktivierung | 71 |
| 3.2.6 Auswirkung von natürlich vorkommenden Androgenrezeptormutationen auf die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 | 76 |
| 3.2.6.1 Mutationen in der Hormonbindedomäne..... | 77 |
| 3.2.6.2 Mutationen in der aminoterminalen Domäne des Androgenrezeptors: Verlängerung der Glutaminhomopolymerfolge | 80 |
| 3.2.6.3 Ein kerntranslokationsdefekter Androgenrezeptor ist noch in der Lage, die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 zu induzieren | 82 |
| 3.2.7 Verschiedene Kinaseinhibitoren und dominant-negative Kinasen verhindern die dihydrotestosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung | 86 |

| | |
|--|-----|
| 4 Diskussion | 91 |
| 4.1 Klassische Funktionen des Androgenrezeptors | 91 |
| 4.1.1 Transaktivierung in Gegenwart von Antiandrogenen..... | 92 |
| 4.1.2 Transrepression in Gegenwart von Antiandrogenen..... | 95 |
| 4.2 Androgene und Signaltransduktion | 97 |
| 4.2.1 Erhöhung der cytosolischen Calciumionen-Konzentration durch Androgen..... | 97 |
| 4.2.2 Androgenrezeptor-vermittelte Phosphorylierung von ERK 1 und 2..... | 98 |
| 4.2.2.1 Aktivierungsschritte der cytoplasmatischen Androgenrezeptorwirkung | 99 |
| 4.2.2.2 Effekt von Kinaseinhibitoren und dominant-negativen Kinasen auf die dihydrotestosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung | 101 |
| 4.2.2.3 Wirkung von Antiandrogenen..... | 106 |
| Abkürzungen | 109 |
| Literatur | 111 |

1 Einleitung

1.1 Physiologische Bedeutung der Androgene während der Embryonalentwicklung des Menschen

Die primäre Bestimmung des Geschlechts erfolgt bei der Befruchtung durch die Kombination der Geschlechtschromosomen. Geschlechtsdimorphismus beginnt beim Menschen zwischen der 5. und der 7. Woche der Embryonalentwicklung durch eine Kaskade molekularer Ereignisse. Die Expression eines Lokus auf dem Y-Chromosom, der vermutlich für das SRY (*sex-determining region of Y chromosome*)-Gen kodiert (Berta et al., 1990, Gubbay et al., 1990), wird als der molekulare Schalter betrachtet, welcher die testikuläre Entwicklung der Gonaden bei XY-Individuen reguliert. Die Kontrolle durch die endokrinen Produkte der Gonaden führt dann zur Bestimmung des phänotypischen Geschlechts in Abhängigkeit vom chromosomalen Geschlecht.

Der erste Schritt bei der männlichen Entwicklung ist die Differenzierung von Sertoli-Zellen aus den primären Gonadensträngen. Sie produzieren das Anti-Müller'sche Hormon, welches die Rückbildung der Müller'schen Gängen bewirkt und so die Entwicklung von weiblichen Gonaden verhindert. Außerdem induzieren sie die Differenzierung von Leydigzellen aus den interstitiellen Zwischenzellen der Hoden (Jost, 1953). Leydigzellen produzieren das Androgen Testosteron, welches zur Klasse der Steroidhormone gehört.

Androgene, die männlichen Sexualhormone, sind für die normale körperliche Entwicklung des Mannes wichtig und dienen der Ausbildung und Aufrechterhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale und der sexuellen Verhaltensweisen. Die Testosteronproduktion der Leydigzellen der Hoden beginnt in der 8. Woche und fördert die Entwicklung von Epididymis (Nebenhoden), Vas deferens und Samenblasen aus dem Wolffschen Gang (Siiteri & Wilson, 1974). Die Entwicklung von Penis, Skrotum und Prostata benötigt die Anwesenheit von 5- α Dihydrotestosteron (DHT), einem Metaboliten von Testosteron. Darum wird im Urogenitalsinus etwa zu dem Zeitpunkt, an dem die Hoden mit der Testosteronbildung beginnen, die Produktion des Enzyms 5 α -Reduktase gestartet, welches die Umwandlung von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron katalysiert (Siiteri & Wilson, 1974, Wilson et al., 1993). In dieser hormonalen Umgebung bilden sich aus der Genitalanlage zwischen der 9. und 12. Woche der menschlichen Embryonalentwicklung Penis und Skrotum. Die Entwicklung der Prostata aus epithelialen Knospen des Urogenitalsinus beginnt in der 10. Woche (Shapiro, 1990). Diese Strukturen verändern sich während der restlichen Embryonalentwicklung und der Kindheit wenig, erst der Anstieg von Testosteron und vor allem Dihydrotestosteron während

der Pubertät ist für ihr Wachstum und die Reifung zu funktionellen Sexualorganen verantwortlich.

1.2 Die kontinuierliche wachstumsfördernde Wirkung von Androgenen führt zu pathophysiologischen Veränderungen der Prostata

Für die vollständige Virilisierung im Laufe der Embryonalentwicklung sind sowohl Dihydrotestosteron als auch Testosteron notwendig. DHT ist jedoch das hauptsächliche androgene Hormon der Prostata. Fehlt die 5α -Reduktase, welche die Umwandlung von Testosteron zu DHT katalysiert, so findet kein Wachstum der Prostata statt (Imperato-McGinley et al., 1974). DHT ist also ein wichtiger mitogener Faktor in der Prostata und eine unabdingbare Voraussetzung für die epitheliale Zellproliferation. Andererseits wird durch die anhaltende Verfügbarkeit von Androgenen nicht nur Wachstum und Differenzierung der normalen sondern auch der pathologisch veränderten Prostata stimuliert (Cunha et al., 1987). Benigne Prostatahyperplasie (BPH) ist das häufigste Leiden aufgrund verstärkter Proliferation eines inneren Organs und Prostatakrebs die am häufigsten diagnostizierte Tumorart und die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern der westlichen Welt (Carter & Coffey, 1990). Offensichtlich ist es das (fehlregulierte) Zusammenspiel von Androgenen, intraprostatatischen Faktoren und Wachstumsfaktoren, das für die langsame aber stetige Wachstumsrate von Prostatatumoren verantwortlich ist (Weinberg, 1989, Sager, 1989, Kassen et al., 1996). Dabei wurde postuliert, daß androgene Hormone vor allem bei der Progression von kleinen, gut differenzierten Tumorherden zu lebensbedrohenden Krebsformen eine Rolle spielen und weniger bei der Initiation der Tumorentstehung (Carter et al., 1990, Nomura & Kolonel, 1991).

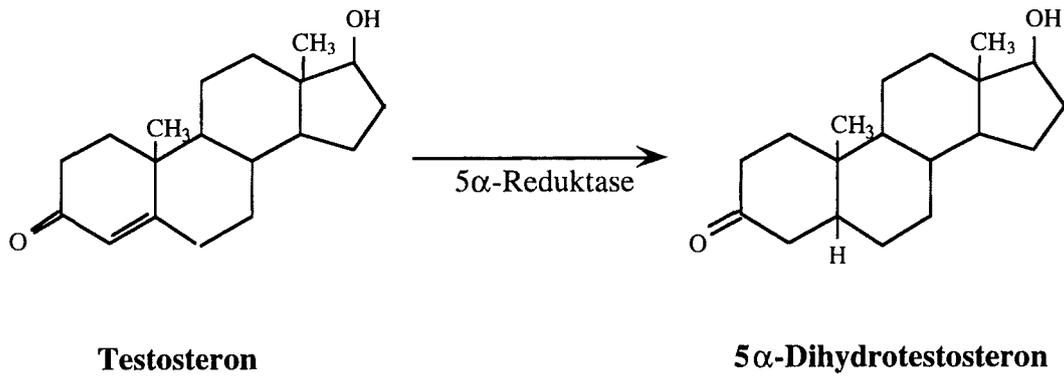
1.2.1 Androgenentzug als Prostatakrebstherapie

Während organbeschränkte Tumoren durch Bestrahlung oder eine radikale Prostatektomie entfernt werden können, ist bei Patienten mit fortgeschrittenem lokalem oder metastasierendem Prostatakrebs nur eine Behandlung durch Hormonentzugstherapie möglich. Durch eine Reduktion des endogenen Androgenspiegels wird so in letzteren Fällen die hormonabhängige Karzinomzellproliferation gehemmt. Dies geschieht entweder operativ durch Kastration (Huggins & Hodges, 1941) oder medikamentös durch Gabe von Analoga des Luteotropin-freisetzenden Hormons (LHRH). LHRH-Analoga bewirken zunächst über einen Anstieg der

hypophysären Sekretion von luteinisierendem (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) eine Stimulation der Testosteronproduktion der Hoden. Ein negativer Rückkopplungsmechanismus über eine Desensibilisierung der Hypophyse durch verringerte Expression des LHRH-Rezeptors führt jedoch schlußendlich zu einer Reduktion der Testosteronmenge auf das Niveau gonadektomierter Patienten (Corbin, 1982, Globe et al., 1987).

Das intraprostatiche Dihydrotestosteron wird zu 60 % aus testikulärem und zu 40 % aus adrenocorticalem Androgen gebildet. LHRH-Analoga haben jedoch keinen Effekt auf die letztgenannte Hormonproduktion der Nebennierenrinde. Um auch die Wirkung der adrenocorticalen Androgene zu hemmen, muß eine erweiterte Therapie angewandt werden, welche die androgene Signalkette in den Zielzellen vollständig unterbricht. Androgene sind kleine lipophile Steroidhormone, welche über den Blutstrom zu ihren Zielzellen transportiert werden. Sie treten durch passive Diffusion in die Zellen ein und binden an einen spezifischen hochaffinen intrazellulären Rezeptor, den Androgenrezeptor (AR), welcher die Funktionen des Hormons in der Zelle vermittelt. Um eine vollständige Androgenblockade zu erreichen, werden deshalb zusätzlich zu LHRH-Analoga oder Orchiektomie Antiandrogene eingesetzt, welche mit dem physiologischen Hormon um die Bindung an den AR konkurrieren (Labrie et al., 1982, Labrie et al., 1993). Dabei kommen steroidische und nicht-steroidische Substanzen zur Anwendung. In Abbildung 1 sind Beispiele für diese Antiandrogenklassen im Vergleich mit Testosteron und α -Dihydrotestosteron dargestellt.

Androgene



Antiandrogene

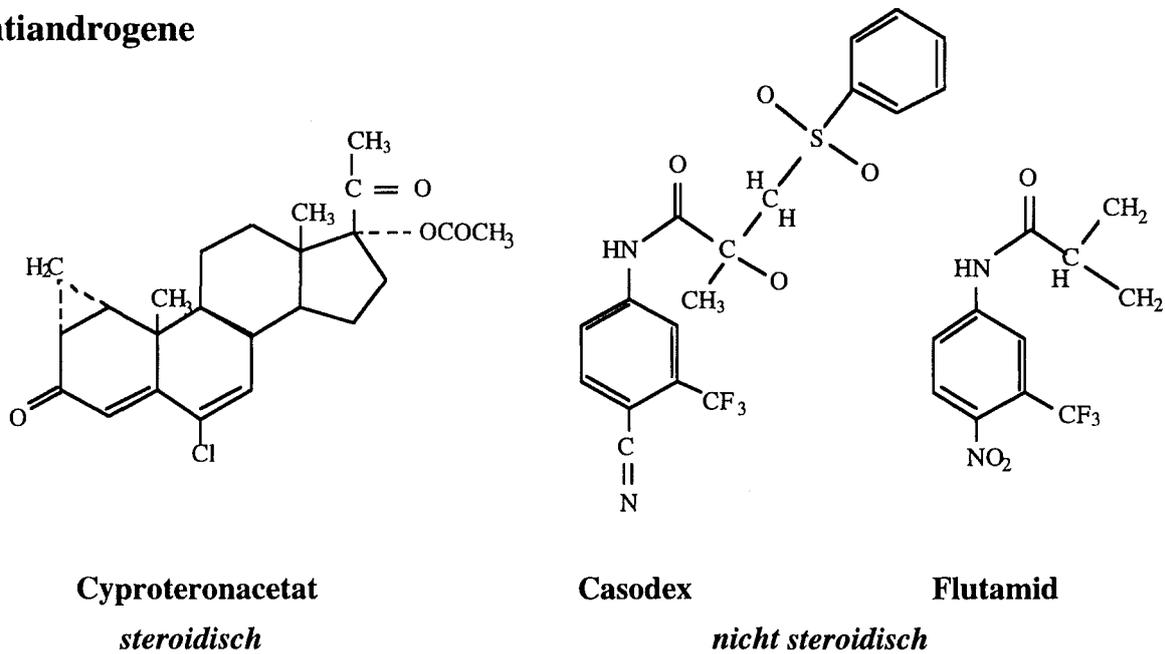


Abb. 1: Struktur physiologischer Androgene und bei der Prostatakrebstherapie eingesetzter Antiandrogene. Darstellung der chemischen Strukturen von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron und der Antiandrogene Cyproteronacetat, Casodex und Flutamid.

1.3 Struktur und Wirkungsweise des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, welche neben dem AR unter anderem die Rezeptoren für die weiblichen Gonadenhormone, Estrogen (ER) und Progesteron (PR) und für Glucocorticoide (GR) und Mineralocorticoide (MR) aus der Nebennierenrinde einschließt. Auch die Rezeptoren für Thyroidhormon (TR), Vitamin D₃ (VDR), Retinsäure (RAR) und 9-cis Retinsäure (RXR) werden zu dieser Gruppe gezählt.

Der Androgenrezeptor befindet sich in seiner inaktiven Form als Apoprotein in Abwesenheit von Hormon vor allem im Cytoplasma der Zelle. Hier liegt er im Komplex mit den Hitzeschockproteinen Hsp90, Hsp70 und Hsp56 sowie weiteren Chaperon-Proteinen vor (Veldscholte et al., 1992, Schowalter et al., 1991, Smith & Toft, 1993). Durch Bindung des spezifischen Hormons erfährt der AR eine Konformationsänderung, wird von diesem cytoplasmatischen Komplex gelöst und in den Zellkern transloziert. Dort kann er als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen positiv oder negativ regulieren.

Das Androgenrezeptorgen besteht aus 8 Exons, die cDNA (Chang et al., 1988, Lubahn et al., 1988, Trapman et al., 1988, Tilley et al., 1989) hat eine Länge von 2,8 kb und kodiert für ein Protein von 910 bis 919 Aminosäuren (AS) mit einer Molekularmasse von 110-112 kDa (Brown et al., 1989, Lubahn et al., 1989). Wie alle Steroidhormonrezeptoren besteht der AR aus einer einzigen Polypeptidkette, die aus relativ deutlich voneinander abgegrenzten funktionellen Domänen zusammengesetzt ist (Simental et al., 1991). Die Domänenstruktur des AR ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

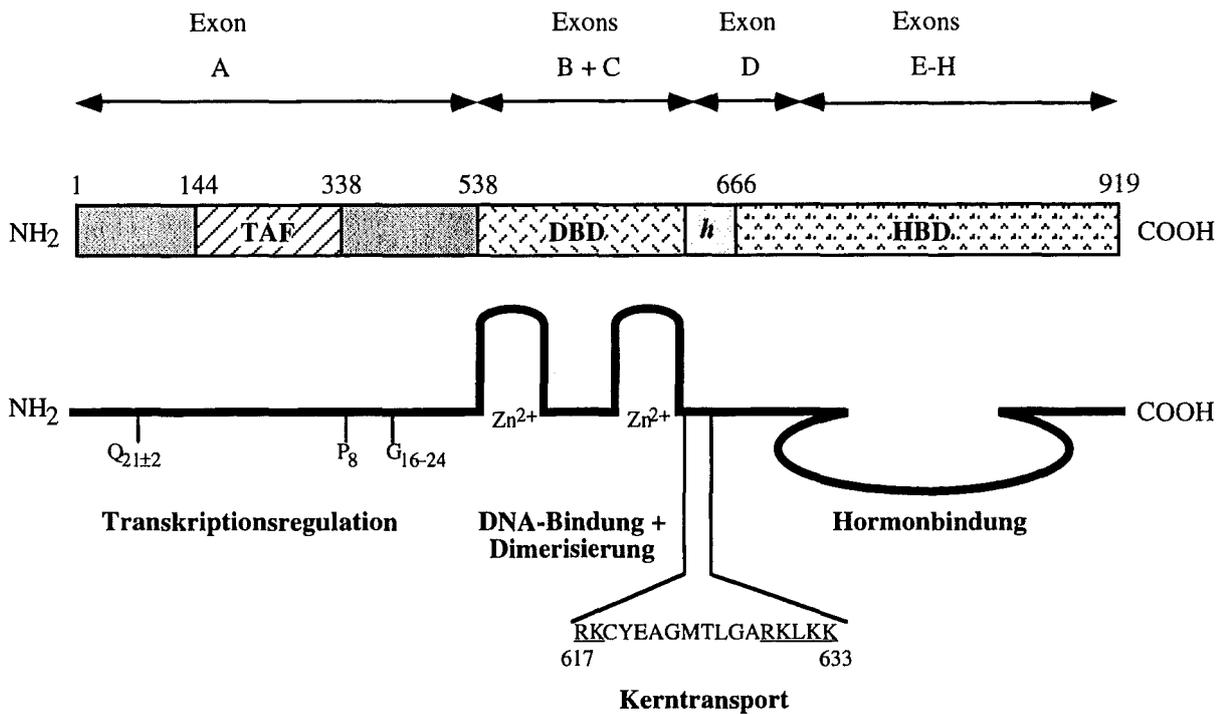


Abb. 2: Funktionelle Domänen des Androgenrezeptors. Schematische Darstellung der 8 Exons des AR (A-H) und der strukturellen Organisation des Proteins. Die Charakterisierung der einzelnen Domänen und ihre Funktion ist im Text beschrieben. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen. NH₂, Aminoterminus; TAF: Transaktivierungsfunktion; DBD, DNA-Bindedomäne; *h*, *hinge* Region; HBD, Hormonbindedomäne; COOH, Carboxyterminus; Q_{21±2}; variable Glutaminhomopolymerfolge (21±2 Glutamine); P₈, Prolinohomopolymerfolge (8 Proline); G₁₆₋₂₄, variable Glycinhomopolymerfolge (16-24 Glycine); Zn²⁺, koordiniertes Zinkion im Zinkfingermotiv; RKCYEAGMTLGARKLKK, Aminosäuresequenz des Kernlokalisierungssignals im Einbuchstabencode (die für den Kerntransport notwendigen basischen Aminosäuren der zweiteiligen Sequenz sind unterstrichen).

Die wenig konservierte amino (N)-terminale Domäne, welche die wichtigste Transaktivierungsfunktion (TAF, Simental et al., 1991, Jenster et al., 1991, Palvimo et al., 1993) enthält, nimmt mehr als die Hälfte des AR-Proteins ein. Als Besonderheit des AR enthält dieser regulatorische Bereich drei Aminosäurehomopolymere, wovon zwei in ihrer Länge variieren und für die variable Aminosäurezahl des Androgenrezeptorproteins verantwortlich sind. Möglicherweise spielen diese AS-Homopolymere eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen (Gerber et al., 1994).

Die zentrale Region enthält zwei Zinkfinger-Motive, bestehend aus jeweils einem Zn²⁺, welches von 4 Cysteinen koordiniert ist (zur Übersicht siehe Freedman, 1992, Truss & Beato, 1993). Diese unter allen Mitgliedern der Steroidrezeptorsuperfamilie hoch konservierte Region ist für die DNA-Bindung des Rezeptors notwendig und wird deshalb als DNA-Bindedomäne bezeichnet (DBD). Der aminoterminale Zinkfinger ist für die Spezifität der DNA-Bindung des AR besonders wichtig, der zweite Zinkfinger stabilisiert die DNA-Rezeptor-Interaktion und vermittelt die Dimerisierung des AR. Direkt an die DBD schließt sich die sogenannte *hinge*-

Region an. Sie kodiert unter anderem für die hoch konservierte Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS), welche den Transfer des AR vom Cytoplasma in den Kern vermittelt (Simental, et al., 1992, Jenster et al., 1993, Zhou et al., 1994).

Im Carboxy (C)-terminalen Bereich befindet sich die Hormonbindedomäne (HBD), welche etwa Aminosäuren 666-919 umfaßt. Sie vermittelt die hochaffine spezifische Ligandenbindung des Rezeptors. Der C-Terminus enthält auch die Bindestellen für das 90 kDa Hsp-Protein (Housley et al., 1990, Simental et al., 1991, Smith & Toft 1993).

1.3.1 Mutationen im Androgenrezeptorgen bei therapieresistenten Prostatumoren

Obwohl erwartet wurde, daß die Anwendung von Antiandrogenen den Androgenrezeptor vollständig in seiner Funktion inhibiert, scheitert die totale Androgenblockade als Therapie bei Prostatakrebs auf längere Sicht. Nach wenigen Jahren schreiten fast alle Tumoren von dem zunächst androgen-abhängigen zu einem androgen-unabhängigen Stadium fort. Zunächst wurde angenommen, daß dieses als Hormoninsensitivität bezeichnete Phänomen auf einen selektiven Vorteil von Zellen durch Verlust der AR-Expression zurückzuführen sei, während AR-exprimierende Zellen in Apoptose gingen. Es erwies sich jedoch, daß fast alle hormontherapie-refraktären Tumoren den AR in großer Menge exprimierten (zur Übersicht siehe Barrack & Tindall, 1987). Es stellte sich deshalb die Frage, ob der AR in dieser androgen-armen Umgebung möglicherweise immer noch funktionell aktiv sein könnte.

Bei der Untersuchung der in Prostatumoren exprimierten Androgenrezeptoren zeigte es sich, daß einige davon somatische Mutationen enthalten. Der erste Hinweis auf die mögliche Bedeutung dieser Mutationen kam von der Prostatakrebszelllinie LNCaP, welche aus Lymphknotenmetastasen eines Prostatakarzinoms etabliert wurde. Diese exprimiert einen AR mit einer Punktmutation in der Hormonbindedomäne, die jedoch nicht zu einem inaktiven Rezeptor führt. Im Gegenteil wird dieser AR neben seiner DHT-Responsivität auch durch Estrogen, Progesteron und die Antiandrogene Hydroxyflutamid (den aktiven Metaboliten von Flutamid) und Cyproteronacetat aktiviert (Veldscholte et al., 1990, Veldscholte et al., 1992). Seither sind verschiedene funktionell aktive somatische AR-Mutanten aus Prostatumoren isoliert worden, welchen, soweit sie charakterisiert wurden, dieses Phänomen der erweiterten Steroidspezifität gemeinsam ist (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Mutationen im Androgenrezeptor bei Patienten mit Prostatakrebs. Die Lokalisation der Mutationen wurde als Aminosäurenposition eines AR mit 919 Aminosäuren angegeben. Zu jeder Mutation wurde, falls bestimmt, die erweiterte Steroidspezifität und die Literaturstelle angegeben, an der sie erstmals beschrieben und näher charakterisiert wurde. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgte im Dreibuchstabencode. HBD, Hormonbindedomäne; N-Terminus, Aminoterminus; DHEA, Dehydroepiandrosteron.

| Position | Mutation | erweiterte Spezifität gegenüber | Referenz |
|-------------------|---------------------------------------|---|--|
| HBD | | | |
| 647 | Ser -> Asn | | Suzuki et al., 1993 |
| 674 | Gly -> Ala | | Koivisto et al., 1997 |
| 701 | Leu -> His | | Taplin et al., 1995 |
| 715 | Val -> Met | DHEA, Androstendion, Progesteron, Androsteron, Androstandiol | Culig et al., 1993, Peterziel et al., 1995, Culig et al., 1996 |
| 721 | Ala -> Thr | | Taplin et al., 1995 |
| 724 | Gly -> Asp | | Taplin et al., 1995 |
| 726 | Arg -> Leu | Estradiol | Elo et al., 1995 |
| 730 | Val -> Met | Androstendion, Androsteron, Androstandiol | Newmark et al., 1992, Peterziel et al., 1995, Culig et al., 1996 |
| 798 | Gln -> Glu | | Evans et al., 1996 |
| 874 | His -> Tyr | DHEA, Estradiol, Progesteron, Hydroxyflutamid | Wainstein et al., 1994, Taplin et al., 1995, Tan et al., 1997 |
| 877 | Thr -> Ala | Progesteron, Estradiol, Cyproteronacetat, DHEA, Hydroxyflutamid | Veldscholte et al., 1990, Ris-Stalpers et al., 1993, Suzuki et al., 1993, Tan et al., 1997 |
| 877 | Thr -> Ser | Estradiol, Progesteron | Taplin et al., 1995 |
| 880 | Leu -> Gln | | Taplin et al., 1995 |
| 896 | Ala -> Thr | | Taplin et al., 1995 |
| 902 | Gln -> Arg | | Taplin et al., 1995 |
| N-Terminus | Gln ₂₄ → Gln ₁₈ | | Schoenberg et al., 1994 |

Die meisten der bisher gefundenen Mutationen befinden sich folgerichtig in der Hormonbindedomäne des Rezeptors (zur Übersicht siehe auch Barrack, 1996, Gelmann, 1996). AR-Mutationen in der Hormonbindedomäne treten bei Prostatatumoren in frühen und späten Stadien auf, wobei alle bisher identifizierten AR-Mutanten die Fähigkeit zur

ligandenabhängigen Transaktivierung beibehalten. Möglicherweise erlaubt die erweiterte Steroidspezifität eine funktionelle Aktivierung des mutierten AR durch andere Steroidhormone und so das Wachstum der Zellen in androgenarmem Milieu. Einige Mutationen sind auch außerhalb der Hormonbindedomäne lokalisiert worden (Schoenberg et al., 1994, Tilley et al., 1996, Crocitto et al., 1997). Es wurde jedoch in diesen Fällen keine Analyse der Funktion durchgeführt und es ist schwierig festzustellen, wie solche Mutationen zum hormonunabhängigen Fortschreiten von Prostata Tumoren beitragen könnten.

AR-Mutationen treten dennoch nur in einer begrenzten Zahl von Tumoren auf, der weitaus größere Teil exprimiert den Wildtyp-AR. Dies weist daraufhin, daß das Entstehen klinisch manifester Prostata Tumoren vor allem durch den normalen Androgenrezeptor vermittelt wird. Die AR-Expression in hormoninsensitiven Tumoren ist offensichtlich in vielen Fällen von einer Amplifikation des AR-Gens begleitet (Visakorpi et al., 1995). Dies könnte eine weitere Anpassung an niedrige Androgenkonzentrationen widerspiegeln, in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß durch lange Kultur von AR-positiven LNCaP-Zellen in androgenfreiem Medium eine verstärkte Expression und erhöhte transkriptionelle Aktivität des AR bewirkt wird (Kokontis et al., 1994). Als Konsequenz könnten niedrige Konzentrationen an Androgen, wie sie von der Nebenniere gebildet werden, ausreichend für eine Stimulation des Tumorstwachstums sein.

Es bleibt jedoch unklar, wie sich die Prostata Tumoren der Inhibition durch Antiandrogene, welche die AR-Wirkung blockieren, entziehen können. Neben der Möglichkeit eines vom Androgenrezeptor unabhängigen Mechanismus (Davies & Eaton, 1991 Landström et al., 1994), wird vorgeschlagen, daß funktionelle Veränderungen des AR oder die agonistische Wirkung von Antiandrogenen bei AR-vermittelten Effekten für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten. Um die Gründe für das Scheitern der Antiandrogentherapie besser zu verstehen ist es infolgedessen wichtig, die verschiedenen Funktionen des Androgenrezeptors und ihre Hormonabhängigkeit zu analysieren.

1.4 Klassische Funktionen des Androgenrezeptors - Transaktivierung und Transrepression

Die klassische Wirkungsweise des Androgenrezeptors ist die positive und negative Regulation von Genen in einer liganden-abhängigen Weise. Diese Funktionsmechanismen des AR sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt und werden im folgenden näher erläutert.

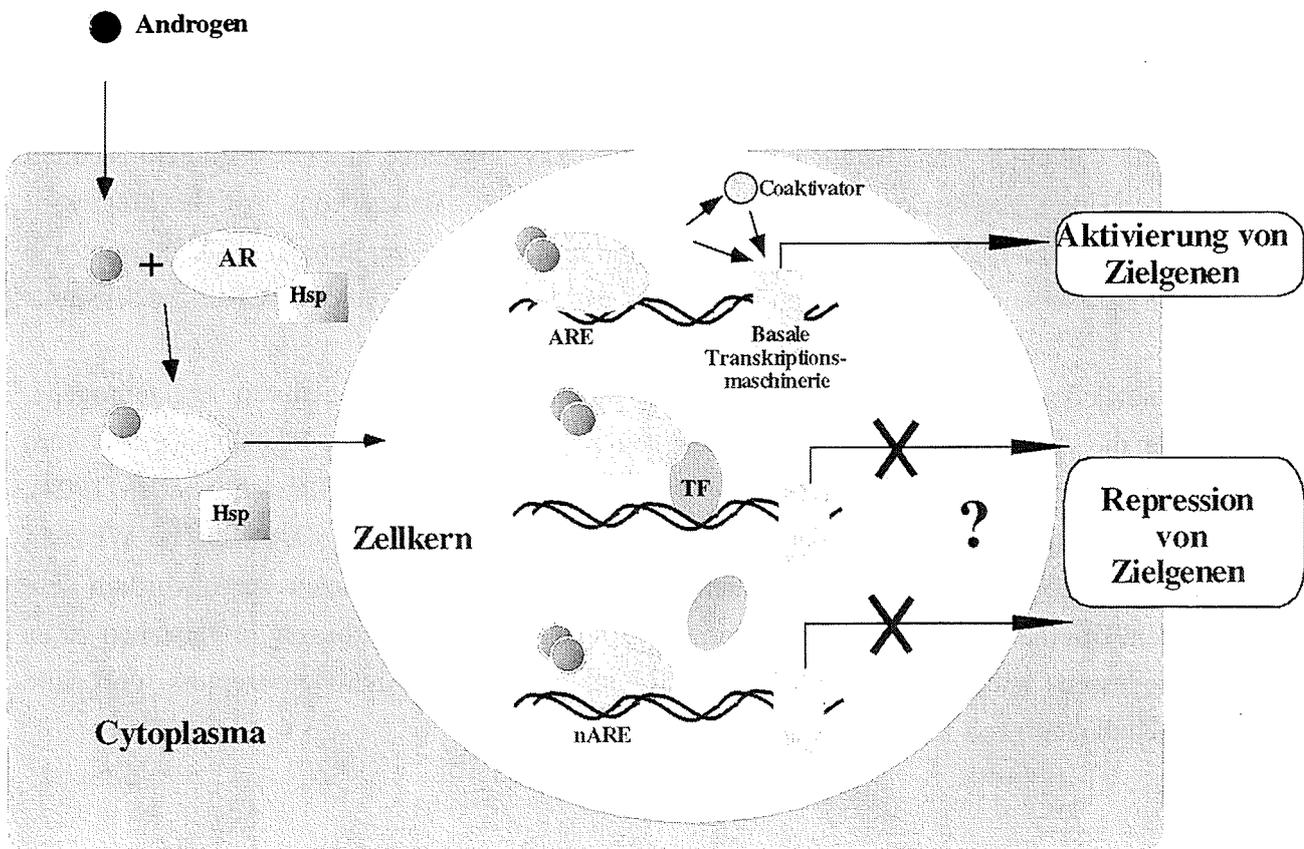


Abb. 3: Modell der klassischen Androgenrezeptorwirkungen. Schematische Darstellung der positiven und negativen Genregulation durch den Androgenrezeptor (Erklärungen im Text). AR, Androgenrezeptor; Hsp, Hitzeschockprotein; TF, Transkriptionsfaktor; ARE, androgen-responsives Element; nARE, negatives androgen-responsives Element.

1.4.1 Transaktivierung durch den Androgenrezeptor

Bei der positiven Genregulation bindet der AR als Homodimer an bestimmte Nucleotidsequenzen im Promotor von induzierbaren Genen, welche als *hormone response elements* (HRE) bezeichnet werden (Kumar & Chambon, 1988, Claessens et al., 1989, De Vos et al., 1991, Brinkmann et al., 1992) und erhöht deren transkriptionelle Aktivität. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß der AR an das palindromische Motiv 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' bindet (Beato 1989), welches auch von Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor erkannt wird (Cato et al., 1987, Ham et al., 1988). Später wurde eine spezifischere Erkennungssequenz des AR identifiziert, dabei handelt es sich um die Nucleotidfolge 5'-GGTTCTTGGAGTACT-3' im Promotor des Probasings, welche in Transfektionsexperimenten Transaktivierung eines Reportergens ausschließlich durch den AR vermittelt (Claessens et al., 1996). Mutationsanalysen haben gezeigt, daß diese Spezifität auf der Tatsache beruht, daß andere Rezeptoren durch den linken Teil der Nucleotidsequenz (unterstrichen) von der Bindung ausgeschlossen werden.

Die Initiation der Transkription von Genen erfordert die Bildung eines Proteinkomplexes (Transkriptionsinitiationskomplex) aus RNA-Polymerase II und verschiedenen basalen Faktoren an der Startstelle der Transkription (TATA-Box). Der AR kommuniziert, möglicherweise durch eine direkte Bindung seiner N-terminalen Aminosäuren 142-485 an den basalen Transkriptionsfaktor TFIIF und das TATA-Boxbindeprotein TBP (McEwan & Gustafsson, 1997), mit diesem basalen Transkriptionsapparat. Diese Interaktion resultiert in der Rekrutierung des Rezeptors an die *androgen response elements* (ARE) in der Promotorregion androgen-responsiver Gene und führt zu deren verstärkter Transkription. Aktivierung durch den AR wird auch durch verschiedene Cofaktoren unterstützt, welche an den Rezeptor binden, so wie der *transcriptional mediator/intermediary factor 2* (TIF2, Voegel et al., 1996), das Androgenrezeptor-assoziierte Protein mit einer Molekularmasse von 70 kDa (ARA₇₀, Yeh & Chang, 1996) und das *cAMP response element binding protein* (CREB)-Bindeprotein CBP (Aarnisalo et al., 1998). Diese Coaktivatoren binden nicht direkt an den basalen Transkriptionsapparat und es ist unwahrscheinlich, daß sie als Brückenmoleküle zwischen AR und den basalen Transkriptionsinitiationsfaktoren wirken. Einige dieser Cofaktoren, z.B. CBP, stimulieren die Transkription, indem sie die Histonacetyltransferase (HAT) p300/CBP-associated factor (P/CAF) zu den Promotoren der Gene, welche sie regulieren, lenken (Yang et al., 1996). CBP selbst besitzt ebenfalls Histonacetyltransferaseaktivität (Bannister & Kouzarides, 1996, Ogryzko et al., 1996). Auf diese Art schafft die Bindung von CBP und P/CAF an den AR einen Multiproteinkomplex mit erhöhter HAT-Aktivität, welcher zur Acetylierung von Chromatin führt.

Es gibt Hinweise, daß eine solche Chromatin-Acetylierung *in vivo* an den Transkriptionsmechanismus gekoppelt ist und daß die Aktivität spezifischer

Histonacetyltransferasen den inhibitorischen Effekt der kompakten Chromatinstruktur auf die Genexpression aufhebt (zur Übersicht siehe Wade & Wolffe, 1997). Ob auch der Cofaktor ARA₇₀ HAT-Aktivität besitzt und ob möglicherweise CBP und ARA₇₀ simultan an den AR binden können, ist noch nicht bekannt.

1.4.2 Transrepression durch den Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor ist nicht nur zur positiven, sondern auch zur negativen Regulation der Genexpression fähig (Léger et al., 1987, Persson et al., 1990, Bellido et al., 1995). Insgesamt ist diese Transrepression durch den AR weniger gut charakterisiert als die Transaktivierung. Die bisher bekannten Mechanismen der negativen Regulation durch den AR können jedoch in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1) eine Form, welche die Interaktion zwischen AR und DNA erfordert und 2) eine Form, welche abhängig von Protein-Protein-Interaktionen ist (siehe Abb. 3).

1.4.2.1 Repression von Genen durch Androgenrezeptor-DNA-Interaktion

Im Falle der negativen Regulation durch Bindung des AR an DNA inhibiert der Rezeptor die Expression des Promotors, an welchen er bindet. Dieses Modell wird am besten am Beispiel des Maspings veranschaulicht, wo die Bindung des AR an ein sogenanntes negatives androgen-responsives Element (nARE) zur Verringerung der Expression führt (Zhang et al., 1997). Der Mechanismus dieser Repression durch Bindung an DNA ist noch weitgehend unbekannt. Analog zu den Coaktivatoren der Transaktivierung wäre es denkbar, daß potentielle Corepressoren mit dem DNA-gebundenen Rezeptor interagieren und das Chromatin durch eine Deacetylierungsreaktion in einen inhibitorischen Zustand bringen. Bisher wurden jedoch keine solchen Corepressoren der negativen genregulatorischen Aktivität des AR gefunden. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die Transrepression durch Interaktion des AR mit bereits gebundenen positiven Regulatoren geschieht. Allerdings ist die negative Regulation des Maspings der bisher einzige beschriebene Fall, bei dem die direkte Bindung des AR an DNA erforderlich ist. Das *androgen response* Element im Promotor der α -Untereinheit des Glycoproteinormons wurde zunächst als verantwortlich für die Transrepression durch den AR betrachtet (Clay et al., 1993). Inzwischen zeigte sich jedoch, daß zwar die DNA-Bindedomäne des AR nicht jedoch DNA-Bindung an sich notwendig ist. Die AR-vermittelte Repression der Expression dieses Gens wird nun auf eine direkte Interaktion des AR mit Faktoren, welche an

ein basales oder an ein *cAMP response element* der Promotorregion binden, zurückgeführt (Heckert et al., 1997).

1.4.2.2 Protein-Protein-Interaktion als Mechanismus der negativen Genregulation durch den Androgenrezeptor

Der hauptsächliche Mechanismus über den der AR die Expression von Genen negativ reguliert beruht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der AR interagiert zum Beispiel mit c-Jun und inhibiert so die DNA-Bindung und damit die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (Kallio et al., 1995). Im Promotor des menschlichen Collagenase I-Gens ist jedoch nicht die c-Jun bindende Aktivator-Protein 1 (AP-1)-Sequenz, sondern eine benachbarte Ets-Bindestelle der Angriffspunkt für die AR-vermittelte Repression. In Protein-Interaktionstests konnte gezeigt werden, daß der AR mit dem Ets-Protein ERM (*ets related molecule*) physikalisch interagiert, welches für die Transkription des Collagenase I-Gens notwendig ist. Offensichtlich sind C-terminale Sequenzen des AR für die Protein-Protein-Wechselwirkung mit ERM verantwortlich, wodurch die regulatorische N-terminale AR-Domäne in eine Position gebracht werden kann, in der sie mit der Transkription in nicht-sequenzspezifischer Weise interferiert (Schneikert et al., 1996).

Ein neuer Mechanismus der negativen Regulation der Genexpression durch den AR wurde nach Untersuchungen der androgen-vermittelten Repression des Interleukin 6-Gens (IL-6) postuliert (Keller et al., 1996). Die Transkription von IL-6 wird durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor-κB* (NF-κB) positiv reguliert, Hemmung durch den AR soll aufgrund der androgen-vermittelten Synthese des NF-κB-Inhibitors IκBα erfolgen. In ähnlichen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch keine solche positive Wirkung des AR auf die IκBα-Synthese festgestellt werden, was eher einen Protein-Protein-Interaktionsmechanismus, wie er für die oben genannten Gene beschrieben wurde, nahelegt (Heck et al., 1997).

1.5 Interaktion zwischen Androgenrezeptor und Signaltransduktionswegen durch zelluläre Regulatoren

Eine dritte Facette der Genregulation durch den AR umfaßt die wachstumsfaktorvermittelte Verstärkung der Transaktivierung durch den Rezeptor. Abhängig vom Promotorkontext erhöhen der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-I (IGF-I) die hormonabhängige Transaktivierung des AR in Transfektionsexperimenten (Reinikainen et al., 1996). Es gibt Beobachtungen, daß sogar eine liganden-unabhängige

Aktivierung des Rezeptors durch Behandlung AR-positiver Zellen mit peptidischen Wachstumsfaktoren wie IGF-I, EGF oder dem Keratinocytenwachstumsfaktor (KGF) erreicht werden kann (Culig et al., 1994, Reinikainen et al., 1996). Außerdem stimuliert cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) die Aktivität eines androgen-abhängigen Reporters synergistisch mit Testosteron (Ikonen et al., 1994, Culig et al., 1995). Gonadotropine selbst können auch synergistisch mit Androgenen die Genexpression erhöhen (Culig et al., 1995). Forskolin, ein Aktivator der Proteinkinase A und Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA), ein Aktivator der Proteinkinase C, üben ähnliche synergistische Wirkungen mit Testosteron aus oder sind sogar zu einer androgen-unabhängigen AR-Aktivierung in der Lage (Nazareth & Weigel, 1996).

Da Wachstumsfaktoren nach Bindung an ihre Rezeptoren Tyrosinphosphorylierung verschiedener Effektormoleküle bewirken, wurde postuliert, daß solche Phosphorylierungen zur Erhöhung der Transaktivierung durch den AR führen könnten. Tatsächlich wird durch Vanadat, einen Inhibitor von Phosphotyrosin-Phosphatasen die ligandenabhängige AR-Wirkung verstärkt, durch Genistein, einen Tyrosinkinaseinhibitor dagegen verringert (Reinikainen et al., 1996). Der Androgenrezeptor wird also nicht nur durch Androgene, sondern auch durch Wachstumsfaktoren und andere zelluläre Regulatoren aktiviert und spielt vermutlich in verschiedenen Signaltransduktionswegen eine Rolle.

1.6 Nicht-genomische Wirkungen von Androgenen

Eine weitere Beteiligung von Androgenen an der zellulären Signaltransduktion wurde durch Beobachtungen schneller nicht-genomischer Effekte deutlich. Die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in LNCaP-Zellen erhöhte sich nach zweiminütiger Behandlung mit DHT (Steinsapir et al., 1991). Eine andere Untersuchung zeigte, daß sowohl $[Ca^{2+}]_i$, als auch die Konzentrationen an Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol bereits wenige Sekunden nach der Behandlung von Osteoblasten der Ratte mit Testosteron anstiegen (Lieberherr & Grosse, 1994). Bisher ging man bei diesen Androgenwirkungen jedoch immer von hormonspezifischen Effekten aus, welche nicht über eine Bindung an den Androgenrezeptor erfolgen.

Wie diese regulatorischen Funktionen von Androgenen zusammenwirken, um das Wachstum von Prostatatumoren zu fördern, ist noch nicht klar. Die Untersuchung der unterschiedlichen Mechanismen darauf, wie sie miteinander in Beziehung stehen und worin sie sich unterscheiden, wird in Zukunft nützliche Informationen darüber liefern, welche Inhibitoren geeignet sind, um die Wirkung des Androgenrezeptors vollständig zu hemmen.

1.7 Fragestellung

Eine Analyse der verschiedenen Funktionen des Androgenrezeptors und ihrer molekularen Mechanismen könnte dazu beitragen, die Gründe für das Scheitern der Antiandrogentherapie besser zu verstehen. Dabei sind vor allem die Wirkungen der Antiandrogene von Bedeutung. Das erste Ziel dieser Arbeit war es darum, die klassischen Funktionen des Androgenrezeptors, also die Transaktivierung und Transrepression von Genen in Gegenwart von Antiandrogenen näher zu charakterisieren. Dabei sollten AR-Mutanten mit Aminosäureaustauschen in der Hormonbindedomäne des Rezeptors, welche aus Prostatatumoren isoliert wurden, daraufhin untersucht werden, ob sie im Hinblick auf diese genregulatorischen Wirkungen einen Funktionsgewinn gegenüber dem Wildtyp-AR besitzen.

Über die nicht-genomischen Wirkungen von Androgenen ist noch sehr wenig bekannt. Bisher wurde für alle bekannten schnellen Wirkungen von Androgenen postuliert, daß es sich um androgen-spezifische aber AR-unabhängige Prozesse handelt. Im zweiten Teil der Arbeit lag deshalb der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der Rezeptorabhängigkeit nicht-genomischer Androgenwirkungen und der molekularen Mechanismen die diesen zugrunde liegen. Auch dabei wurde die Auswirkung verschiedener bei pathologischen Erkrankungen gefundener AR-Mutationen und der Effekt von Antiandrogenen in die Analyse mit einbezogen.

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 (SeaKem LE) | Biozym Diagnostik, Hameln |
| Aktivkohle | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) | Boehringer, Mannheim |
| Aminosäuren-Mix (ohne Methionin) | Promega, Madison, WI, USA |
| Ammoniumperoxodisulfat | Bio Rad Laboratories GmbH, München |
| Ampicillin | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Anisomycin (<i>Streptomyces griseus</i>) | Calbiochem, Bad Soden/Taunus |
| Aprotinin | 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 |
| Casodex | Schering AG, Berlin |
| Coomassie Brillantblau R250 | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Cyproteronacetat | Schering AG, Berlin |
| DEAE-Membran, NA 45 | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Dextran | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Dihydrotestosteron | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| 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 |
| <i>Easy Pure</i> DNA-Elutionskit | Biozym GmbH., Hess. Oldendorf |
| <i>ECL Western blotting detection reagents</i> | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| EDTA | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| EGTA | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| EGF, rekombinant, menschlich | Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf, Schweiz |
| Ethanol | Roth GmbH + Co., Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Ethylacetat | Merck, Darmstadt |
| Ficoll 400 | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Filterpapier Whatman 3MM | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| Fötales Kälberserum | Gibco BRL Life Tech., Eggenstein |
| Ficoll | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Folin-Ciocalteus Phenolreagenz | Merck, Darmstadt |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Formaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Formamid | Meck, Darmstadt |
| Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) | Calbiochem, Bad Soden/Taunus |
| GF109203X (Bisindolylmalmeid I) | Calbiochem, Bad Soden/Taunus |
| D-Glucose | Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Glycylglycin | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Harnstoff | Roth GmbH + Co., Karlsruhe |
| HEPES | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Hydroxyflutamid | Schering AG, Berlin |
| 8-Kammer Glasobjektträger | Nunc, Wiesbaden |
| Kieselgel-DC-Platten | Macherey-Nagel, Düren |
| Lachsspermien-DNA, Typ III | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Lambda DNA | Gibco BRL Life Tech. LTD; Paisley, UK |
| Leupeptin | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| 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 |
| Myelin-basisches Protein | Gibco BRL Life Tech., Eggenstein |
| Natriumdodecylsulfat | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Nonidet P40 | Bio Rad Laboratories GmbH, München |
| Nucleotide (ATP, dA/G/C/TTP, ddA/G/C/TTP) | Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim |
| Nutrient Broth | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Nylon-Membran (Hybond N+) | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| Oligo-dT-Zellulose | Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg |
| PD98059 | Calbiochem, Bad Soden/Taunus |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco BRL Life Tech., Eggenstein |
| Phenol | Roth GmbH + Co., Karlsruhe |
| Phenylmethylsulfonyl-Fluorid | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Immobilon TM -P) | Millipore, Bedford, MA, USA |
| <i>Prime-It II Random Primer Labeling Kit</i> | Stratagene GmbH, Heidelberg |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Merck, Darmstadt |
| Protein A-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| Quiagen-tip-500-Säulen | Diagen GmbH, Hilden |
| Quarzsand | Roth GmbH + Co., Karlsruhe |
| Rinderserumalbumin | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Röntgenfilme (Hyperfilm TM MP/ECL) | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| RPMI 1640 Kulturmedium | Gibco BRL Life Tech., Eggenstein |
| Sephadex G-50 | Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg |
| Sequenase DNA Sequencing Kit | United States Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA |
| Sterilfilter | Renner GmbH, Dannstadt |
| Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safe) | Packard Instr. Comp., Meriden, CT, USA |

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin | Bio Rad Laboratories GmbH, München |
| 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Tris-HCl, Tris-Base | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Triton X-100 | Bio Rad Laboratories GmbH, München |
| tRNA (aus Hefe) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Tween 20 | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Trypsin (für Zellkultur) | Gibco BRL Life Tech., Eggenstein |
| Wortmannin | Calbiochem, Bad Soden/Taunus |
| Zellkulturartikel | Greiner, Nürtingen |
| Zellkulturschalen-/flaschen für LNCaP | Becton-Dickinson, Heidelberg |

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 |
| [³² P] γATP | 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, USA

modifizierende Enzyme

| | |
|--|---|
| DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) | Promega, Madison, WI, USA |
| Proteinase K | Merck, Darmstadt |
| RNAse A | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Sequenase (modifizierte Form der T7-DNA-Polymerase) | United States Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA |
| T4 DNA Ligase | Promega, Madison, WI, USA |

2.2 Plasmidkonstrukte

Reporter-gen-Plasmide für transiente Transfektionen

ARE₂ TATA CAT (Klein-Hitpass et al., 1990)

Dimerisierte *hormone response elements* des Tyrosin-Aminotransferasegens der Ratte vor Positionen -41 bis -29 des HSV-Thymidinkinasepromotors und Positionen -33 bis -21 (enthalten TATA-Box) des Hühner Ovalbuminpromotors

-517/+63 Coll-luc (Schneikert et al., 1996)

Position -517 bis +63 des menschlichen Collagenase I-Gens vor dem *Firefly* Luciferase-Reporter-gen

pHCwt luc (Heck et al., 1997)

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

pG5.E4Δ38 lux3 (erhalten von P. Shaw, Nottingham, UK)

Pentamer der Bindestelle des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 vor den Positionen +1 bis +38 des Adenovirus E4 Promotor und dem *Firefly* Luciferase-Reporter-gen (verändert nach Kamano et al., 1995) in pGL3 (Promega, Madison, WI, USA)

Expressionsplasmide für transiente Transfektionen

pSGAR_{wt} (Culig et al., 1993a)

menschliche cDNA des Wildtyp-Androgenrezeptor im Vektor pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pSGAR V715M (Culig et al., 1993a), **pSGAR V730M** (Peterziel et al., 1995)

Androgenrezeptormutanten mit einem Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin an Position 715 bzw. 730 im Vektor pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pSG424 (Webster et al., 1988, Schmitz und Baeuerle, 1991).

DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 der Hefe im Vektor pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pSG-Gal4-Elk1 (Gille et al., 1995b)

Vollständige cDNA von Elk-1 fusioniert an die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 der Hefe im Vektor pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, USA **pRSV-H20** (Offringa et al., 1990)

auf pRSV neo basierendes Plasmid, bei dem die neo-Sequenz durch eine *multiple cloning site* ausgetauscht wurde

pRSV-cRafC4 (Bruder et al., 1992).

Dominant-negative Deletionsmutante von cRaf-1, 257 aminoterminalen Aminosäuren, enthalten Cysteinfinger-Motiv (CR1)

p85 Δ (Dhand et al., 1994)

Deletionsmutante ($\Delta 478-513$) des bovinen p85 α im Vektor SR α (Takebe et al., 1988)

Androgenrezeptor-Expressionsplasmide für stabile Transfektionen

pRC/RSV ARwt, pRC/RSV AR V715M und pRC/RSV AR V730M

erhalten durch Bgl II-Verdau der Plasmide pSGARwt, pSGAR V715M und pSGAR V730M und anschließende *blunt end* Ligation in den durch Verdau mit Hind III linearisierten Vektor pRC/RSV nach Auffüllen der überstehenden Enden von Vektor und Insert.

Die Plasmide **pcDNA AR R617P** und **pcDNA AR Q77** wurden erhalten durch BamHI/BglII-Verdau der Plasmide pSG AR R617P (erhalten von H. Klocker, Universitätsklinik Innsbruck, Österreich) und pSG AR Q77 und anschließende Ligation in den durch Verdau mit BamHI linearisierten Vektor pcDNA3 (Invitrogen)

2.3 Sonden für RNA-Hybridisierungen

GAPDH (Ratte)

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

fos (viral)

PstI-Fragment aus dem Plasmid pUC9-v-fos (Curran et al., 1982, Rahmsdorf et al., 1987)

2.4 Antikörper

anti-hAR

F39.4.1 (BioGenex)

monoklonaler (Maus-) Antikörper gegen AS 301-320 des menschlichen Androgenrezeptors **sp061** (erhalten von A. Brinkmann, Rotterdam, Niederlande)

polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen Aminosäuren 301-320 des menschlichen AR

Phosphospezifische Antikörper für MAPK-Isotypen

anti-phospho-MAPK (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus), polyklonaler Antikörper gegen Aminosäuren 196-209 (DHTGFLTEY*VATRWC) des menschlichen ERK 2 (p42), erkennt phosphorylierte Formen von ERK 1 und ERK 2 (* bedeutet phosphoryliertes Tyrosin)

anti-phospho-p38 (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus), polyklonaler Antikörper gegen Aminosäuren 171-186 der menschlichen p38 MAPkinase mit phosphoryliertem Y* an Position 182

anti-phospho-JNK/SAPK (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus)

anti-ERK 1 (Santa Cruz, CA, USA), polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 305-327 des Ratten-ERK 1

Sekundärantikörper für Western blot-Analysen

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

anti-mouse, Polyklonale IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen Maus-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).

Sekundärantikörper für den Immunfluoreszenznachweis des Androgenrezeptorproteins

Polyklonale IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Maus-Immunglobuline, Rhodamin (TRITC)-markiert (Dianova GmbH, Hamburg)

2.5 Bakterien und eukaryontische Zellen

Bakterienstamm für Klonierungen

E. coli DH5 α

Genotyp: F⁻, Φ 80 Δ lacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169

Zellen und Kulturbedingungen

Zelllinien

CV-1

Affennierenzelllinie; androgenrezeptor-defizient. CV-1 Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) kultiviert.

Cos-7

Affennierenzelllinie; Androgenrezeptor-defizient. Cos-7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert.

LNCaP

Menschliche Prostatakarzinomzelllinie; LNCaP-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS in Primaria Kulturschalen oder -flaschen (Becton-Dickinson, Heidelberg) kultiviert.

PC3

Menschliche Prostatakarzinomzelllinie; PC3-Zellen und alle durch stabile Transfektion erhaltenen PC3-Zellklone wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS kultiviert.

Primäre Zellen

VHF 73

Menschliche primäre Genitalhautfibroblasten mit Wildtyp-Androgenrezeptor (erhalten von H. Klocker, Abteilung für Urologie der Universitätsklinik Innsbruck); VHF 73-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert.

PM 58

primäre glatte Muskelzellen der Prostata eines befundfreien Mannes (erhalten von H. Klocker, Abteilung für Urologie der Universitätsklinik Innsbruck); PM 58 wurden in DMEM 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 Volumenprocente (v/v). Alle angegebenen Konzentrationen sind als Endkonzentrationen zu verstehen.

2.6 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nucleinsäuren

Extraktion von Nucleinsäuren

Zur Reinigung einer wässrigen Nucleinsäurelösung von Proteinen wurden zur Lösung (Mindestvolumen von 100 µl) dieselben Volumina Phenol (gesättigt mit 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) und Chloroform (als Gemisch Chloroform/Isoamylalkohol 24:1) gegeben und gut gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde kurz zentrifugiert (10.000 g, 5 min). Proteine sammeln sich zwischen den beiden sich ausbildenden Phasen. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und nochmals mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und abzentrifugiert, um das Phenol vollständig zu entfernen. Die so gereinigte nucleinsäurehaltige Oberphase wurde dann zur weiteren Verwendung abgenommen.

Fällung von Nucleinsäuren

Um Nucleinsäuren aus einer wässrigen Lösung zu präzipitieren, wurde die Lösung mit 1/10 Volumen 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.

Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung einer wässrigen Nucleinsäurelösung 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 mg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA.

Die Extinktion bei 280 nm zeigt Verunreinigungen durch Proteine an. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} sollte im Idealfall bei DNA etwa 1,8 und bei RNA etwa 2 betragen, sonst ist eine weitere Reinigung der Nucleinsäuren nötig.

2.7 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 2-5 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/Glycerinlösung. Bei einem Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben, andernfalls wurde zuerst der Verdau mit dem Enzym niedriger Ionenstärke durchgeführt und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung das zweite Enzym mit entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke zupipettiert. Bei Plasmid DNA aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0,5 µg/µl 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 Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 bis 2 % (w/v) (je nach Größe der DNA-Fragmente). Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) 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 1x TAE-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-Fragmentlängenstandard (BstEII, 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 photographiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Bande eines zu isolierenden DNA-Fragments wurde auf dem Agarosegel unter UV-Durchlicht lokalisiert und mit einem Skalpell ein Schnitt direkt unter die Bande geführt. In

diesen Schnitt wurde ein Stück DEAE-Membran eingesetzt. Bei der weiteren Elektrophorese wurde das DNA-Fragment vollständig an die Membran gebunden. 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 wurden die Membranstücke entfernt, eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und das DNA-Fragment zur weiteren Verwendung mit Ethanol gefällt.

Alternativ zur Elution über eine DEAE-Membran erfolgte die DNA-Isolierung aus einem Agarosegel mit Hilfe des Easy Pure Kits der Firma Biozym GmbH. Hess. Oldendorf nach den Angaben des Herstellers.

Präparation von Vektoren für die Subklonierung

5-10 µg der Vektor-DNA wurden mit einem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut, und durch Isolierung aus einem Agarosegel gereinigt. Der Ansatz wurde daraufhin für 5 min auf 65°C erhitzt, um eine "Streckung" der DNA-Fäden zu erzielen, welche die DNA-Enden für die anschließende Dephosphorylierung zugänglicher macht.

Dephosphorylieren von 5'DNA-Überhängen mit CIP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)

Für die 5'Dephosphorylierung von linearisierter, gelgereinigter DNA wurde eine Phosphatase-Behandlung durchgeführt. Die DNA wurde mit 2U alkalische Phosphatase (CIP, Boehringer, Mannheim) in 1 x CIP-Puffer (100 mM Glycin pH 10,5, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂) in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37°C, wobei nach 30 min noch einmal dieselbe Menge Enzym zugegeben wurde. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 1/10 Volumen 10x STE (1M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) und 2,5 % 20 % (w/v) SDS und 20-minütige Inkubation bei 75°C. Die dephosphorylierte DNA wurde danach durch Elution aus einem Agarosegel gereinigt.

Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem äquimolaren Verhältnis zusammengegeben und mit 3 U T4-DNA-Ligase in 20 µl 1x Ligasepuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) über Nacht bei 15°C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden 10 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

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, 10mM MgCl, 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von E. coli DH5 α 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 μ l Aliquots bei -80°C eingefroren.

Transformation von Bakterien (nach Hanahan, 1986)

Zu 200 μ l kompetenten Bakterien wurden auf Eis 10 μ l 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, 10mM 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 μ l SOC-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Selektivagarplatten (1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium* mit 100 μ g/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

2.8 Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

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

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 μ g/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Bakterienkultur wurde 1ml abgenommen, 5 min bei 5000 g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 μ l 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.

2.9 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).

Material und Methoden

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 Plasmidlösung mit 2 µl 5x 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 abkühlen lassen. Zu dem Reaktionsansatz wurden dann 2 µl Markierungslösung (1,5 µM dGTP, 1,5 µM dCTP, 1,5 µM dTTP), 1 µl 0,1M DTT, 1 µl [³⁵S] γATPaS 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-Nucleotid) 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: jeweils 80 µM dGTP, dATP, dCTP und dTTP, 50 mM NaCl, 8 µM ddGTP

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

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

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

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 1x 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 (20x40 cm) mit 0,15 mm dicken Abstandhaltern gegossen. Nach Einsetzen eines geeigneten Kammes zum Aussparen der Probenaschen und Auspolymerisieren des Gels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x 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 Laboratories GmbH, München) getrocknet. Das Gel wurde dann über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert.

2.10 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 "rediprime-Kit" der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig durchgeführt. Hierzu wurden 25 ng DNA-Fragment einem Volumen von 45 µl durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C und anschließende 5-minütige Inkubation bei 0°C denaturiert. Danach wurde der Ansatz in ein rediprime-Röhrchen gegeben. Dieses enthält ein Lyophilisat aus den notwendigen dNTPs, DNA-Polymerase, kurzen DNA-Stücken zufälliger Sequenz, welche als Primer für die Polymerisation dienen, und Reaktionspuffer. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mM, 10 mCi/ml) und 10 min Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 µl 0,5M EDTA gestoppt.

Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten durch Gelfiltration

Die Reinigung des markierten Fragments von nicht-inkorporierten Nucleotiden 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.

2.11 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) Na₂CO₃, 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) CuSO₄) wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur stengelassen. 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 10-15 % Trenngel und einem 5 % Sammelgel und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen rundherum mit Agarose abgedichtet. Für eine 10%, 12 % oder 15 % Trenngellösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS und 10%, 12 % oder 15 % 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 % Sammelgellösung 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 Probenaschen 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-Banden den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Wurden ³⁵S-Methionin markierte Proteine aufgetrennt, so wurde das Gel (nach entsprechender Vorbehandlung) auf Whatman 3MM Papier aufgezogen und auf einem Gelrockner (Bio Rad Laboratories GmbH, 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-Brillantblau angefärbt oder auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.18).

Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

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

2.12 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

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen. Diese Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz von der Kulturschale abgelöst und mit geringerer Dichte 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 (1-5 min). Dann wurden die Zellen mit frischem Medium abgespült, resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf

neue Kulturschalen verteilt. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen ausgesät.

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 Zellkulturschale mit Medium gegeben.

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

Mit dieser Methode wurde fötales Rinderserum (fetal calf serum, FCS) über Aktivkohle gereinigt, um im Serum noch vorhandene Hormone zu entfernen. Bei Experimenten mit Hormonbehandlung der Zellen wurde dann CCS an Stelle von FCS im Kulturmedium verwendet. Hierzu wurden 50 ml dextransgebundene Aktivkohle (25 g Aktivkohle, 2,5 g Dextran, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 pro Liter H₂O) 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 nun von Hormonen gereinigte Serum sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.13 Messung der freien cytosolischen Calciumkonzentration

Vorbehandlung der Zellen

Jeweils 10³ Zellen pro Kammer wurden auf 8-Kammer Glasobjektträger (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und für 3 Tage in RPMI mit 3 % CCS inkubiert. Einen Tag vor der Farbstoffbeladung der Zellen wurde das Medium durch RPMI ohne Phenolrot mit 0,5 CCS ersetzt.

Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3

Der fluoreszierende Farbstoff Fluo-3 ist ein Fluoreszinderivat mit maximaler Anregung bei 490 nm, dessen Fluoreszenz nach Bindung von Calcium auf das 40fache ansteigt. Dem Fluoreszenzfarbstoff wurde Pluronsäure (0,5 % v/v) zugesetzt, ein anionisches Detergenz, welches die Aufnahme in die Zellen erleichtert. Der Farbstoff wird als Acetomethylester verwendet und kann durch seinen lipophilen Charakter ohne Permeabilisierung in die Zellen eindringen. In der Zell wird der Ester hydrolysiert und verliert dadurch seine lipophilen eigenschaften. Der Farbstoff kann deshalb nicht mehr durch die Cytoplasmamembran diffundieren und verbleibt in der Zelle.

Die Beladung der Zellen mit Fluo-3 (2 μ M) erfolgte in serumfreiem RPMI ohne Phenolrot, pH 7,3, welchem 10 mM HEPES, 4 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂ (Beladungsmedium) zugesetzt wurden für 45 min unter ständigem Schütteln bei 37 °C. Die Zellen wurden zweimal mit dem Beladungsmedium gewaschen und frisches Medium zugegeben. Bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Analyse der Induktorwirkung und Verarbeitung des Fluoreszenzsignals

Die Zellen auf den Objektträgern wurden direkt am Ölimmersionsmikroskop (DMIL, Leica, Stuttgart, Objektiv/Okular 100/1,3) mit 0,1 nM DHT (bzw. 10 mM Ionophor oder 0,1 % Ethanol) behandelt und die Veränderung der Calciumkonzentration als Fluoreszenzsignal mit einer automatischen Kamera (Kappa, Gleichen) während eines Gesamtzeitraums von 60 sec alle 5 sec aufgenommen. Um die Unterschiede in der Fluoreszenzstärke zu verdeutlichen, wurden die Aufnahmen in Falschfarbenbilder umgewandelt.

2.14 Transiente Transfektionen

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

Diese Methode wurde verwendet, um CV-1-, Cos-7- und PC3-Zellen zu transfizieren. PC3-Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion in RPMI mit 3 % CCS kultiviert, CV-1- und Cos-7-Zellen in DMEM mit 3 % CCS. Je nach Experiment wurden 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 9 cm Kulturschale einen Tag vor der Transfektion in DMEM mit 3 % CCS ausgesät. Für die Herstellung des Präzipitats wurden alle Lösungen (außer der DNA) auf 37°C vorgewärmt. Falls nicht anders vermerkt, wurden jeweils 10 μ g Plasmid-DNA pro Kulturschale transfiziert. Die Präzipitatbildung wurde in einem Volumen von 500 μ l pro Kulturschale durchgeführt. Hierzu wurde die DNA zunächst in H₂O gegeben (H₂O-Volumen: 250 μ l abzüglich der Volumina der DNA- und der CaCl₂-Lösung). Dann wurden 250 μ l 2 x HBS (274 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1 mM D-Glucose, 40 mM HEPES, pH 7,05) zugegeben

Material und Methoden

und die Lösung gut gemischt. Unter Schütteln wurden dann 25 µl 2,5 M CaCl₂ 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. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen für 2 min mit 4 ml 15 % Glycerin in PBS geschockt, zweimal mit 10 ml 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 8 ml frisches Medium mit 3 % CCS zugegeben. Die weitere Behandlung der Zellen bis zur Ernte erfolgte im Einzelnen wie im Ergebnisteil angegeben.

Elektroporation für den Androgenrezeptor-Immunnachweis (Eul et al., 1989)

Jeweils 2 x10⁶ Cos7-Zellen pro Ansatz wurden am Vorabend der Transfektion ausgesät. Für die Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, bei 400 g zentrifugiert und in 1 x HBS für Elektroporation (20 mM HEPES, 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM Glucose, pH 7,1) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl 1 x HBS pro Ansatz aufgenommen, in 0,2 cm Elektroporationsküvetten mit je 15 µg der Expressionsvektoren von Wildtyp-AR und AR R617P versetzt und etwa 5 min auf Eis stehen gelassen. Die Elektroporation erfolgte mit einem Genepulser-Apparat (Bio Rad Laboratories GmbH, München) bei 200 Volt und 500 µF. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen in frischem DMEM-Kulturmedium aufgenommen, in 5 cm Petrischalen, welche Deckgläschen für die Mikroskopie enthielten, verteilt.

2.15 Stabile Transfektionen

Die Transfektion der PC3-Zellen wurde nach dem Protokoll der Calciumphosphat-Copräzipitation (siehe 2.13) durchgeführt. 24 h nach dem Glycerolschock wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Selektion der Zellklone, welche stabil das transfizierte Konstrukt aufgenommen hatten, erfolgte 2 Tage später durch Zugabe von 600 ng/ml G418 ins Medium. Die G418-resistenten Zellklone wurden vereinzelt und in frisches Selektionsmedium aufgenommen. Durch Western blot-Analyse (Kapitel 2.19) oder durch transiente Transfektion mit einem geeigneten Reporterplasmid (Kapitel 2.14) wurden die Zellklone auf die Expression des gewünschten Proteins untersucht. Das G418-Selektionsmedium wurde für die gesamte Kultivierungsdauer der Zellklone beibehalten.

2.16 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 cotransfizierten 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 CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) 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 Bestimmung der Proteinmenge (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 (100 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 ¹⁴C-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 wurden 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) ausgewertet. 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:

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

2.17 Analyse der Genexpression durch den Luciferaseaktivitätstest (nach de Wet et al., 1987)

Präparation von Proteinextrakten für Luciferase-Analysen

Die transient mit einem Luciferase-Reportergen cotransfizierten 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 Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) 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 Zellysat 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 2.11) und direkt für den Enzymtest verwendet.

Luciferaseaktivitätstest

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 Luciferaseaktivität dokumentiert.

2.18 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 3×10^6 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. Nach Behandlung mit den angegebenen Induktoren wurden die Zellen 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-TuraxTM-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-Cellulose 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-Cellulose binden. Die Oligo-dT-Cellulose 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-Cellulose 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 Hefe-tRNA (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 1x 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 1x 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) fotografiert 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 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7) drei Lagen Whatman 3MM-Papier (in 20x 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 Probenaschen 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 2h im 65°C-Wasserbad in 200 ml Vorhybridisierungs-Lösung (4x SSC, 3,3 % PiPPi*, 1x Denhard's Lösung**, 0,1 % (w/v) SDS). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde in der zweiten Stunde der Vorhybridisierung 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 3×10^6 cpm/ml der radioaktiv markierten DNA-Sonde (siehe 2.11) (10 min bei 95°C denaturiert) in 4x SSC, 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS und 20 $\mu\text{g/ml}$ 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 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 200 mM NaH_2PO_4 , 300 mM Na_2HPO_4 , pH 7,3

**50x 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: 1x SSC, 3,3 % PiPPi, 0,1 % (w/v) SDS

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

2.19 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 die Zellen auf 5 cm Kulturschalen ausgesät. Die Kultivierung und Behandlung der Zellen erfolgte wie im einzelnen im Ergebnisteil angegeben. Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit eiskaltem 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 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 Zellysat 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. 25-50 μl einer Probe (gleiche Proteinkonzentration) in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.11) 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 Laboratories GmbH, 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 Primäantikörper (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 Sekundäantikörper (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 Primäantikörper gebundenen Sekundäantikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Sollten die Membranen mit den phospho-spezifischen MAPK-Antikörpern für ERK 1 und 2, p38 oder JNK1 und JNK2 hybridisiert werden, so wurde als Puffer (auch für das Waschen) TBST (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween) verwendet. Das Blockieren der Membran erfolgte in 5 % Milch in TBST für 1 h, der phospho-spezifische primäre Antikörper wurde mit 5 % BSA in TBST 1:1000 verdünnt und 4 h bis über Nacht auf der Membran belassen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in 5 % Milch in TBST.

Die Detektion mittels Chemolumineszenz 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 frischbereiteten 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.

2.20 Immunfluoreszenznachweis des Androgenrezeptorproteins

Zwei Tage nach der Transfektion von Cos-7-Zellen durch Elektroporation (siehe 2.13) wurde das Kultivierungsmedium gegen DMEM mit 3 % CCS ausgetauscht und die Zellen für ca. 16 h inkubiert. Die Induktion erfolgte für vier Stunden mit 100 nM DHT oder 80 % Ethanol.

Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung der Zellen

Nach einmaligem Waschen mit PBS (für dieses Experiment wurde stets PBS ohne Calcium/Magnesium verwendet) wurden die Zellen durch Inkubation mit 3 % Paraformaldehyd in wässriger Lösung für 15 min fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen für 15 min mit 50 mM NH₄Cl behandelt.

Die NH₄Cl-Lösung wurde wiederum abgesaugt und die Deckgläschen 5 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS bedeckt. Nach Waschen PBS wurden die Zellen mit PBS mit 0,2 % Gelatine für 20 min vorinkubiert, um unspezifische Bindung abzusättigen. Die Inkubation mit dem AR-spezifischen Antikörper F 39.4.1 (BioGenex) erfolgte für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:10 in PBS mit 0,2 % Gelatine bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurde der Rhodamin (TRITC)-markierte Ziege anti-Maus-Sekundärantikörper (Dianova GmbH, Hamburg) in einer Verdünnung von 1: 50 in PBS mit 0,2 % Gelatine für 1 h ebenfalls direkt auf die Deckgläschen appliziert. Anschließend wurde für 5 min 1:1000 in PBS verdünntes bis-Benzimid (Hoechst Nr. 33250, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) für die Kernfärbung zugegeben. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Einschlußmedium (*mounting medium*, Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträger montiert, mit Nagellack abgedichtet und bis zum Betrachten im Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.21 *In vitro* Immunkomplex-Kinasetest mit Myelin-basischem Protein

Herstellen der Na₃VO₄-Stammlösung (Krypta et al., 1988)

Na₃VO₄ (100 mM) wurde in H₂O gelöst und der pH-Wert mit rauchender HCl (37%) auf 10 eingestellt, wobei ein Farbumschlag der Lösung nach gelb erfolgt. Die Lösung wurde daraufhin im kochenden Wasserbad erhitzt, bis die gelbe Farbe wieder verschwand; der pH-Wert wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur nochmals bestimmt. Diese Stammlösung konnte für maximal 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Immunpräzipitation der Proteine ERK 1 und ERK 2

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, auf Eis mit 500 µl-1 ml GRB2-Puffer (30 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat, 10 mM NaF), welchem 5 mM Na₃VO₄, 10 µg/µl Aprotinin, 10 µg/µl Leupeptin und 1 mM PMSF unmittelbar vor Gebrauch zugefügt worden waren, lysiert und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Kerne wurden durch 15 min Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C pelletiert. Die Überstände wurden in Gegenwart von Protein A-Sepharose (30 µl gepacktes Volumen) und einer 1:100 Verdünnung des ERK 1-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology) für 2-3 h bei 4°C rotiert. Die an die Sepharose gekoppelten Antigen/Antikörperkomplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren (10 s, 10.000 g, 4°C) pelletiert und dreimal mit je 1 ml Lysispuffer und einmal mit 1 ml 25 mM Tris pH 8,0 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose mit einer Kanüle trockengesaugt.

***In vitro* Kinasetest**

Die Sepharose mit den immunpräzipitierten Proteinen wurde mit 50 µl Kinasepuffer (25 mM Tris pH 8,0, 20 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM DTT) versetzt, welchem 5 µg Myelin-basisches Protein und 1 µl ³²PγATP (370 Bq) zugesetzt wurden, und für 30 min bei 30°C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 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) abgestoppt. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert, gut gemischt, weitere 5 min denaturiert und auf ein 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran elektrotransferriert und die Membran autoradiographiert.

3 Ergebnisse

Androgene regulieren Entwicklung und Funktion der Prostata (Bruchovsky et al., 1975) und spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Prostatakarzinomen (Huggins & Stevens, 1940). Die Behandlung von fortgeschrittenem Prostatakrebs erfolgt deshalb durch Hemmung der Androgenwirkung, um das Wachstum der Tumoren zu verlangsamen. Bereits 1941 wurde die Kastration als eine wirksame Therapie bei metastasierenden Prostatatumoren eingeführt (Huggins & Hodges, 1941). Der resultierende Androgenentzug bewirkt Schrumpfen oder Rückbildung von Prostata und Primärtumoren durch Apoptosis der epithelialen Drüsenzellen (Kyprianou, & Isaacs, 1988, Kyprianou et al., 1990, Sensibar et al., 1990, zur Übersicht siehe Buttyan, 1991). Die Konzentration von 5α -Dihydrotestosteron (DHT), des wichtigsten androgenen Hormons in der Prostata, entspricht jedoch innerhalb der Drüse auch nach Kastration noch 40% derjenigen nicht-kastrierter Männer (Geller et al., 1984, Bélanger et al., 1989). DHT entsteht durch Metabolisierung von C19-Steroiden, wie Dehydroepiandrosteron (DHEA) oder Androstendion, die in der Nebenniere synthetisiert und freigesetzt werden (Krieg et al., 1979). Um die androgene Wirkung in den Zielzellen vollständig zu blockieren, wurde als zusätzliche oder alleinige Therapie die Behandlung mit Antiandrogenen eingeführt (Labrie et al., 1982, Crawford et al., 1989). Antiandrogene blockieren die androgene Wirkung auf der Ebene des Androgenrezeptors (AR), des Proteins, welches die physiologischen Funktionen von Androgenen vermittelt. Sie konkurrieren mit den androgenen Hormonen um die Bindung an den Rezeptor, bewirken jedoch nicht seine vollständige Transformation in eine transkriptionell aktive Form (Neumann & Töppert, 1986, Raynaud & Ojasoo, 1986).

Nach einiger Zeit reagieren die meisten Prostatatumoren jedoch nicht mehr auf eine Hormonablationstherapie, man bezeichnet dieses Stadium als Hormoninsensitivität (Crawford et al., 1990, Buttyan, 1991). Es zeigte sich, daß diese fehlende Reaktion auf Hormonentzug in den meisten Fällen nicht auf einem Verlust der Expression des Androgenrezeptors beruhte. Im Gegenteil ist in der weitaus größeren Zahl von Primärtumoren und Metastasen fortgeschrittener Prostatakarzinome das AR-Protein immunhistochemisch nachweisbar (Masai et al., 1990, Sadi et al., 1991, van der Kwast et al., 1991, Hobisch et al., 1995, Kleinerman et al., 1996).

Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre das Auftreten von Mutationen im AR, welche die normale Kontrolle der transkriptionellen Aktivität des AR durch den Liganden aufheben könnten, zum Beispiel indem sie zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führen. Bisher wurden verschiedene somatische Mutationen in Androgenrezeptoren aus Prostatakarzinomen identifiziert, welche zwar nicht die Aktivität in Abwesenheit eines Liganden, aber eine erweiterte Steroidspezifität des Rezeptors bewirken (Schuurmans et al., 1988, Newmark et al., 1992, Culig et al., 1993a, siehe Tabelle 1 in Abschnitt 1.4.2). Dies könnte die funktionelle Aktivierung des mutierten Rezeptors auch in einer Umgebung mit verringerter testikulärer Androgenmenge ermöglichen.

3.1 Mutationen in der Hormonbindedomäne bewirken die Induzierbarkeit des Androgenrezeptors durch Antiandrogene

Eine Mutation im Androgenrezeptor wurde beispielsweise in der Prostatakrebszelllinie LNCaP (Horoszewicz et al., 1983) identifiziert. LNCaP-Zellen exprimieren einen mutierten AR mit einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin an Position 877 in der Hormonbindedomäne (AR T877A). Dieser Austausch resultiert in einer im Vergleich zum Wildtyp-AR erweiterten Steroidspezifität gegenüber Progesteron, Estradiol und Dehydroepiandrosteron (DHEA). Außerdem wurde eine AR T877A-vermittelte Transaktivierung androgen-abhängiger Gene in Gegenwart der bei der Antihormontherapie eingesetzten Antiandrogene Cyproteronacetat und Hydroxyflutamid beobachtet (Veldscholte et al., 1990, Ris-Stalpers et al., 1993).

Die Funktionen des AR beschränken sich jedoch nicht nur auf die Transaktivierung androgen-responsiver Gene, sondern schließen auch die hormonabhängige Genrepression und die Interaktion mit dem Wachstumsfaktoren-Signaltransduktionsweg ein. Um die Auswirkung von Mutationen in der Hormonbindedomäne auf diese AR-Wirkungen näher zu charakterisieren, wurden zwei mutierte Androgenrezeptoren verwendet, welche bei Patienten mit Antiandrogentherapie-resistenten Tumoren gefunden wurden. Die Mutationen in diesen Rezeptoren resultieren in einem identischen Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin an den benachbarten Positionen 715 (AR V715M) und 730 (AR V730M, Newmark et al., 1992). In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Mutante AR V715M ein erhöhtes Transaktivierungspotential in Gegenwart von Progesteron, der adrenalen Steroide DHEA und Androstendion (Culig et al., 1993a) aufweist.

In dieser Arbeit wurde das Verhalten dieser beiden AR-Mutanten bezüglich der verschiedenen AR-Funktionen analysiert und mit dem des Wildtyp-AR verglichen.

3.1.1 Zwei Mutationen in der Hormonbindedomäne führen zu einem erhöhten Transaktivierungspotential des Androgenrezeptors in Gegenwart von Antiandrogenen

Die Transaktivierung von Genen durch den AR erfolgt durch Bindung von Rezeptor-Homodimeren an sogenannte *androgen response elements* (ARE) in der Promotorregion androgen-abhängiger Gene (Claessens et al., 1989, De Vos et al., 1991, Brinkmann et al., 1992). Zur Analyse der Transaktivierung durch den Wildtyp-AR und die Mutanten AR V715M und AR V730M in Gegenwart von Antiandrogenen wurde das androgen-induzierbare Reportergen ARE₂ TATA CAT verwendet, welches zwei solche *hormone response elements* vor einer TATA-Box und dem bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferasegen (CAT) enthält. Vor der Transfektion wurden die Zellen für zwei Tage in Anwesenheit von 3 % Aktivkohle-behandeltem Serum (CCS) kultiviert. Foetales Kälberserum enthält geringe Mengen Hormon mit androgener Aktivität; die Behandlung mit Aktivkohle erfolgte, um diese Hormone möglichst vollständig zu entfernen. Das Reporterplasmid ARE₂ TATA CAT wurde transient mit dem jeweiligen Rezeptor-Expressionsplasmid in AR-negative CV-1 Affinierungszellen cotransfiziert. Durch Messung der CAT-Enzymaktivität wurde die Stärke der Induktion des Reporters in Gegenwart von Dihydrotestosteron (DHT) beziehungsweise der Antiandrogene Hydroxyflutamid und Casodex bestimmt. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente.

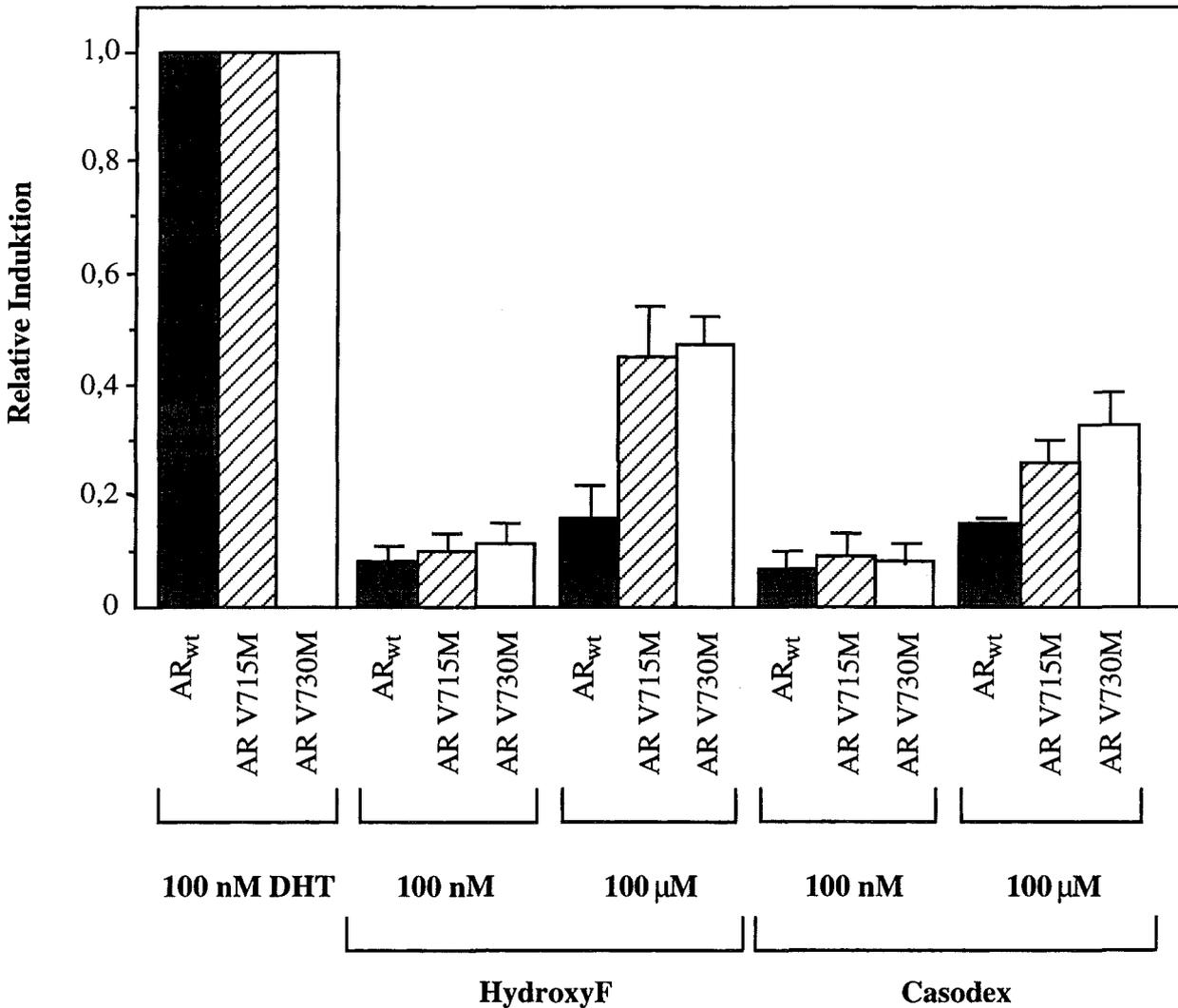


Abb. 4: Transaktivierung durch Wildtyp- und mutierte Androgenrezeptoren in Gegenwart der Antiandrogene Casodex und Hydroxyflutamid. Cotransfektion des Reporterplasmids ARE₂ TATA CAT mit den AR-Expressionsplasmiden pSGAR_{wt}, pSGAR V715M und pSGAR V730M zur Untersuchung der Wirkung von Antiandrogenen auf AR-abhängige Transaktivierung. Nach zweitägiger Kultivierung in Medium mit 3 % Aktivkohle-behandeltem Serum (CCS) wurden 5 x 10⁵ CV-1 Zellen pro Schale mittels der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode mit jeweils 9 µg ARE₂ TATA CAT und 1 µg der AR_{wt}-, AR V715M-, oder AR V730M-Expressionsplasmide transient transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 nM DHT, 100 nM bzw. 100 µM Casodex, 100 nM bzw. 100 µM Hydroxyflutamid (HydroxyF) oder als Kontrolle mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine behandelt. Nach 36 h wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität von Extrakten gleicher Proteinmenge bestimmt. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels eines *Phosphoimager* (PhosphoImager, Fujix BAS 1000). Der CAT-Aktivität in Gegenwart von DHT wurde für alle Rezeptoren der Wert 1 zugeordnet. Die Aktivität von Wildtyp- und mutierten Rezeptoren in Gegenwart der anderen Induktoren wurde relativ dazu ausgedrückt. Das Säulendiagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Transfektionsexperimenten dar. Die Enzymaktivitäten in Anwesenheit des Wildtyp-AR wurden durch dunkel gepunktete, die von AR M715V durch gestreifte und die von AR V730M durch hell gepunktete Säulen bezeichnet.

DHT in einer Konzentration von 100 nM führte bei Wildtyp-AR und beiden Mutanten zu einer ähnlichen Erhöhung der CAT-Aktivität, darum wurde der DHT-Induktion für alle Rezeptoren der Wert 1 zugeordnet. Die Aktivitäten in Gegenwart der Antiandrogene wurden für die einzelnen Rezeptoren jeweils relativ zu diesem Wert ausgedrückt.

Behandlung der Zellen mit 100 nM Hydroxyflutamid oder Casodex bewirkte (verglichen mit 100 nM DHT) keine signifikante Induktion des ARE₂TATA CAT-Reporters durch Wildtyp-AR oder die mutierten Rezeptoren. Bei einer Steigerung der Antiandrogenkonzentrationen auf 100 µM zeigten jedoch beide Mutanten ein deutlich erhöhtes Transaktivierungspotential im Vergleich zu AR_{wt}. In Gegenwart von Hydroxyflutamid lag die Induktionsstärke drei mal höher und war damit knapp halb so groß wie die in Gegenwart von 100 nM DHT. Bei Casodexbehandlung der Zellen war der Effekt etwas weniger stark ausgeprägt, hier erreichte die Induktion der CAT-Aktivität durch AR V715M und AR V730M durchschnittlich etwa ein Drittel der DHT-Induktion. Auch die Aktivität des Wildtyp-AR ist in Gegenwart von 100 µM Hydroxyflutamid und Casodex leicht erhöht.

Die zwei untersuchten Mutationen bewirkten also in Bezug auf die Transaktivierung eines androgen-responsiven Reporters eine höhere Aktivität des Androgenrezeptors in Gegenwart von Antiandrogenen im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor. Diese Eigenschaft verschafft den Tumoren, welche diese mutierten Rezeptoren exprimieren, möglicherweise einen selektiven Wachstumsvorteil unter den Bedingungen der Antihormontherapie.

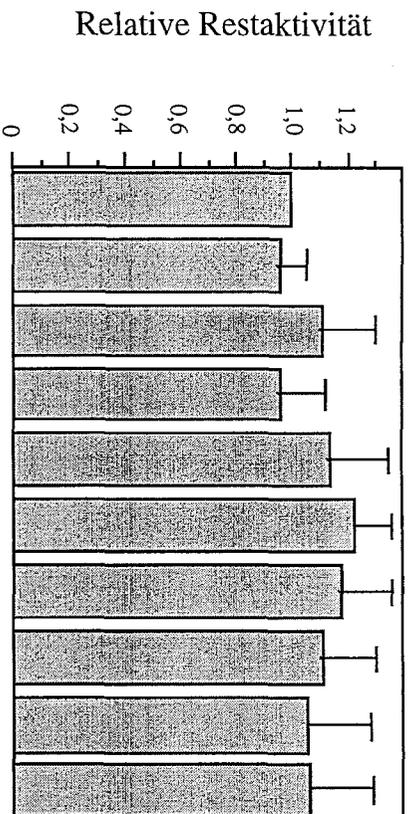
3.1.2 Wildtyp- und mutierte Androgenrezeptoren hemmen die Aktivität eines Collagenase I-Reporters in Anwesenheit von Androgen und Antiandrogenen

Transaktivierung von androgen-responsiven Genen ist jedoch nur eine der Wirkungen des Androgenrezeptors als Transkriptionsfaktor. Er ist darüber hinaus auch in der Lage, die Aktivität von Zielgenen zu hemmen (Léger et al., 1987, Persson et al., 1990, Bellido et al., 1995). Die Auswirkung von Mutationen in der Hormonbindedomäne des AR auf diese transreprimierende Wirkung, insbesondere in Gegenwart von Antiandrogenen, ist noch wenig untersucht. Im folgenden wurde darum der Antiandrogeneffekt an einem androgen-reprimierten Gen analysiert.

Zu den Zielgenen, deren Expression durch den AR negativ reguliert wird, gehören Matrix-Metalloproteinasen, wie beispielsweise Collagenase I (Schneikert et al., 1996). Die Expression der menschlichen Collagenase I kann durch Behandlung von Zellen mit Phorbolestern wie 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induziert werden, welche den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1) aktivieren. AP-1 kooperiert mit einem Mitglied der Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren bei der Bindung an den Collagenase I-Promotor und bei der transkriptionellen Aktivierung des Gens (Schneikert et al., 1996). Zur Charakterisierung der transreprimierenden Eigenschaften von AR_{wild}, AR V715M und AR V730M wurde untersucht, ob sie in der Lage sind, die induzierte Transkription von Collagenase I in Gegenwart von Antiandrogenen zu hemmen. Dazu wurde in transienten Transfektionsexperimenten, wiederum in den rezeptor-negativen CV-1-Zellen, die Wirkung von DHT und unterschiedlichen Konzentrationen der Antiandrogene Casodex und Hydroxyflutamid auf die TPA-induzierte Expression eines Indikatorgens analysiert.

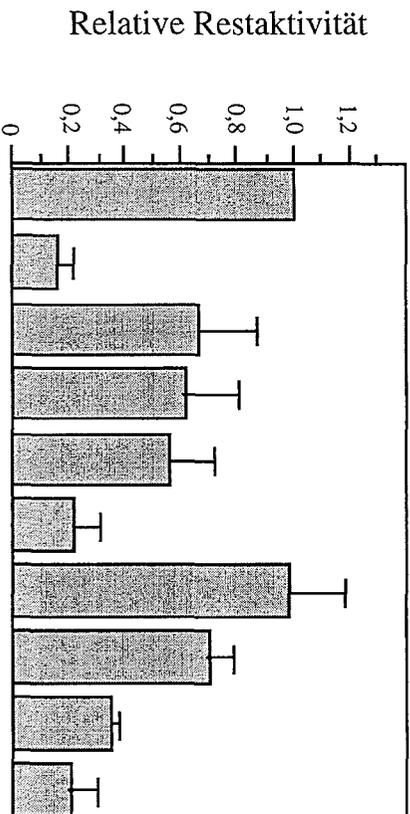
Dieses Indikatorgen enthält die Positionen -517 bis +63 des Collagenase I-Promotors vor einem Luciferase-Reportergen (-517/+63 Coll-luc). Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in Abbildung 5 dargestellt.

A



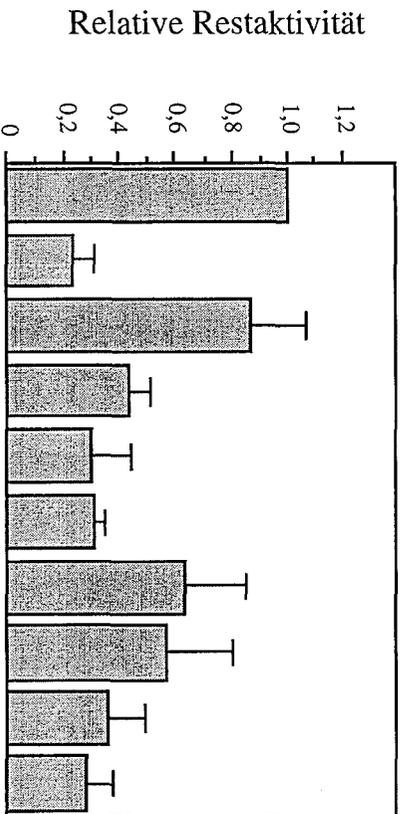
Leervektor

B



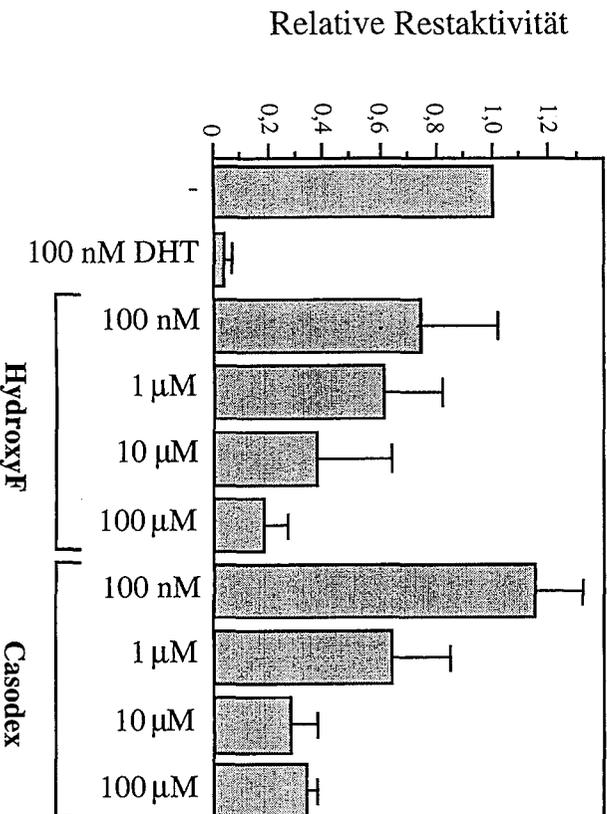
AR^{wt}

C



AR V715M

D



AR V730M

HydroxyF

Casodex

Abb. 5: Transrepression des Collagenase I-Reporters durch den Androgenrezeptor in Anwesenheit von Androgen und Antiandrogen. Nach zweitägiger Kultivierung in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem Serum (CCS) wurden 5×10^5 CV-1 Zellen pro Schale mittels der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode mit jeweils 9 μg des Indikatorplasmids -517/+63 Coll-luc und 1 μg der Expressionsplasmide pSG5 (Leervektor, **A**), pSGAR_{wt} (**B**), pSGAR V715M (**C**) oder pSGAR V730M (**D**) transient transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen mit 80 ng/ml TPA behandelt. Außerdem erfolgte die Zugabe von 100 nM DHT, bzw. Hydroxyflutamid (HydroxyF) oder Casodex in Konzentrationen von 100 nM, 1 μM , 10 μM oder 100 μM oder als Kontrolle von Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine. Nach 36 h wurden die Zellen geerntet und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferaseaktivität von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) bestimmt. Die Säulendiagramme stellen die mittlere relative Restaktivität des Luciferasekonstrukts in Anwesenheit der angegebenen Substanzen dar. Die Auswertung erfolgte durch Division der Luciferaseaktivität in Anwesenheit von TPA und Hormon durch diejenige in Anwesenheit von TPA alleine. Der TPA-induzierten Reporteraktivität ohne Hormon wurde dabei der Wert 1 zugeordnet, alle anderen Werte wurden relativ dazu ausgedrückt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dar.

In Abwesenheit von TPA wurde das transfizierte Collagenase I-Konstrukt nur in geringer Menge exprimiert. TPA führte zu einer Erhöhung der Expression auf etwa das 20-fache. Die TPA-induzierte Aktivität wurde durch DHT in Anwesenheit von Wildtyp- und mutierten AR reprimiert, nicht jedoch, wenn nur ein leeres Expressionsplasmid cotransfiziert wurde (Vergleiche Abb. 5, B-D mit A). Die Restaktivität des Indikatorplasmids in Anwesenheit des Androgenrezeptors betrug nach Behandlung mit 100 nM DHT bei AR_{wt} und AR V715M ca. 20 %, bei AR V730M wurde sie vollständig reprimiert (5 %). Durch Behandlung der Leervektor-transfizierten Zellen mit steigenden Konzentrationen an Antiandrogenen wurde kein Einfluß auf die Expression des Collagenase I-Reporters sichtbar (Abb. 5 A). Die Ergebnisse mit den AR-exprimierenden Zellen zeigen jedoch, daß der Rezeptor auch in Gegenwart von Antiandrogen die Fähigkeit zur Transrepression besitzt. Während bei einer Konzentration von 100 nM Hydroxyflutamid keine oder nur eine geringfügige Inhibition der Expression des Collagenase I-Reporters durch Wildtyp-AR und die Mutanten zu erkennen war, wurde diese Hemmung mit steigender Antiandrogenkonzentration deutlicher und erreichte bei 100 μM fast das Niveau der Repression in Anwesenheit von 100 nM DHT. Der Effekt war bei der Mutante AR V715M (Abb. 5 C) am stärksten ausgeprägt, hier war eine Dosis von 1 μM Hydroxyflutamid bereits ausreichend für eine 60 %ige Hemmung der Reporteraktivität. Die Dosis-Wirkungs-Relation der Hemmung in Anwesenheit von Casodex zeigte einen ähnlichen Verlauf, auch hier war der Effekt der Mutante AR V715M etwas stärker. Insgesamt zeigte sich jedoch, daß sowohl Wildtyp-AR als auch die untersuchten Mutanten in der Lage waren, die Expression des Collagenase I-Reporters in Anwesenheit von Antiandrogenen zu hemmen. Sie unterschieden sich dabei nur geringfügig in ihren Anforderungen an die Antiandrogenkonzentration.

Die hier beschriebenen Aminosäureaustausche in der Hormonbindedomäne des Rezeptors führen also zu einem erhöhten Transaktivierungspotential der mutierten AR, haben jedoch

keinen Einfluß auf die Transrepression des Collagenase I-Reporters. Sowohl Wildtyp- als auch die mutierten Rezeptoren konnten das Indikatorgen in Anwesenheit der Antihormone transreprimieren. Dies zeigt, daß die Antiandrogene agonistische Wirkung besitzen und auch den Wildtyp-AR bei der negativen Regulation aktivieren können. Für die Ausübung dieser transreprimierenden Funktion sind bereits Konzentrationen im mikromolaren Bereich ausreichend. Solche Konzentrationen konnten im Serum antiandrogen-therapierter Patienten nachgewiesen werden (Bélanger et al., 1988), was auf eine *in vivo* Signifikanz der Fähigkeit des Androgenrezeptors zur negativen Genregulation in Gegenwart von Antiandrogenen hinweist.

Obwohl eine Reihe von Mutationen in Primärtumoren und Metastasen von therapieresistenten Prostatakrebspatienten beschrieben worden sind, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil in androgenarmem Milieu geben könnten, wird in den meisten dieser Zellen der Wildtyp-AR exprimiert (Newmark et al., 1992, Culig et al., 1993b, Ruizeveld de Winter et al., 1994). Die Frage, wie es dennoch zu einem androgen-insensitiven Status der Tumoren kommen kann, ist noch weitgehend ungeklärt. Die Beobachtung, daß der Wildtyp-Rezeptor nicht oder nur in geringem Ausmaß in der Lage ist, Gene in Anwesenheit von Antiandrogenen zu induzieren, weist daraufhin, daß es andere AR-Wirkungen geben muß, welche auch in Gegenwart von Antiandrogenen funktionell aktiv sind. Eine Möglichkeit ist die negative Regulation von Genen, welche der Wildtyp-Rezeptor, wie hier am Beispiel der Collagenase I gezeigt, auch nach Bindung von Antiandrogen vermitteln kann.

Eine weitere Erklärung wäre, daß Funktionen, welche der Androgenrezeptor neben seiner klassischen Wirkung als Transkriptionsfaktor besitzt, durch Antiandrogene nicht inhibiert werden können. Interaktionen mit der Signaltransduktion durch zelluläre Mediatoren wie Wachstumsfaktoren könnten dabei eine wichtige Rolle spielen.

3.2 Einfluß von Androgenen auf zelluläre Signaltransduktionswege

Eine Beteiligung von Androgenen an der zellulären Signaltransduktion wurde durch Beobachtungen schneller nicht-genomischer Effekte deutlich. Ein Beispiel ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in LNCaP-Zellen nach zweiminütiger Behandlung mit DHT (Steinsapir et al., 1991). Eine andere Untersuchung an Osteoblasten der männlichen Ratte zeigte, daß sowohl die Ca^{2+} -, als auch die Konzentrationen an Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) bereits wenige Sekunden nach der Behandlung der Zellen mit Testosteron erhöht waren (Lieberherr & Grosse, 1994). Bei diesen schnellen Androgeneffekten wurde ein hormonspezifischer aber vom klassischen Androgenrezeptor unabhängiger Mechanismus postuliert (Steinsapir et al., 1991, Lieberherr & Grosse, 1994, Benten et al., 1997, Farhat et al., 1996). Sowohl LNCaP-Zellen als auch Osteoblasten exprimieren einen funktionellen (im Fall der LNCaP-Zellen mutierten) Androgenrezeptor. Es läßt sich also in diesen Zellsystemen keine eindeutige Aussage über die Beteiligung des Androgenrezeptors an der beobachteten Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und der Freisetzung der *second messenger* IP_3 und DAG machen. Falls sich jedoch herausstellen sollte, daß der Androgenrezeptor solche schnellen Effekte vermittelt, so könnte die Analyse verschiedener weiterer mutierter Rezeptoren auf diese Funktion hin, zu einem besseren Verständnis dieser Androgenwirkung beitragen.

3.2.1 Die dihydrotestosteron-induzierte Erhöhung von freiem cytosolischem Calcium ist abhängig von der Anwesenheit des Androgenrezeptors

Zunächst wurde die Frage der Rezeptorabhängigkeit bei der Veränderung der cytosolischen Calciumionenkonzentration durch Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit Dihydrotestosteron geklärt. Zu diesem Zweck wurden Zellen der menschlichen AR-negativen Prostatakarzinomzelllinie PC3 (Kaighn et al., 1979) entweder mit einem Plasmidkonstrukt, das die cDNA des menschlichen Wildtyp-AR unter Kontrolle des Promotors des Rous Sarcoma Virus (RSV) enthielt (PC3 AR_w), oder mit dem entsprechenden leeren Vektorkonstrukt stabil transfiziert (PC3 LV). In diesen Zellen wurden die Änderungen der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Androgenbehandlung bestimmt.

Zur Messung von $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 verwendet. Mit diesem Farbstoff können die zu untersuchenden Zellen „beladen“ werden. Fluo-3 reichert sich in der Zelle an und bildet einen stabilen Komplex mit freien Calciumionen. Diese Komplexe (nicht aber der Ca^{2+} -freie Farbstoff) fluoreszieren bei einer Wellenlänge von 530 nm nach Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 485 nm; die Fluoreszenzstärke ist dabei der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration proportional (Rijkers et al., 1990, Merritt et al., 1990). Die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte am Ölimmersionsmikroskop mittels *Videoimaging*, da das (aufgrund der geringen Schichtdicke der adhärent wachsenden PC3-Klone) relativ niedrige Fluoreszenzsignal keine spektroskopische Analyse erlaubte. Es ließen sich daher nur qualitative Aussagen über die Calciumänderung machen, eine quantitative Auswertung war nicht möglich. Zunächst wurden die Zellen im Phasenkontrast photographiert und anschließend die basale Calciumkonzentration als Grundfluoreszenz bestimmt. Die PC3-Zellklone wurden dann mit 100 pM DHT behandelt und während 1 min wurde alle 5 sec das Fluoreszenzsignal mit Hilfe einer automatischen Kamera aufgenommen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 6 dargestellt.

A PC3 LV

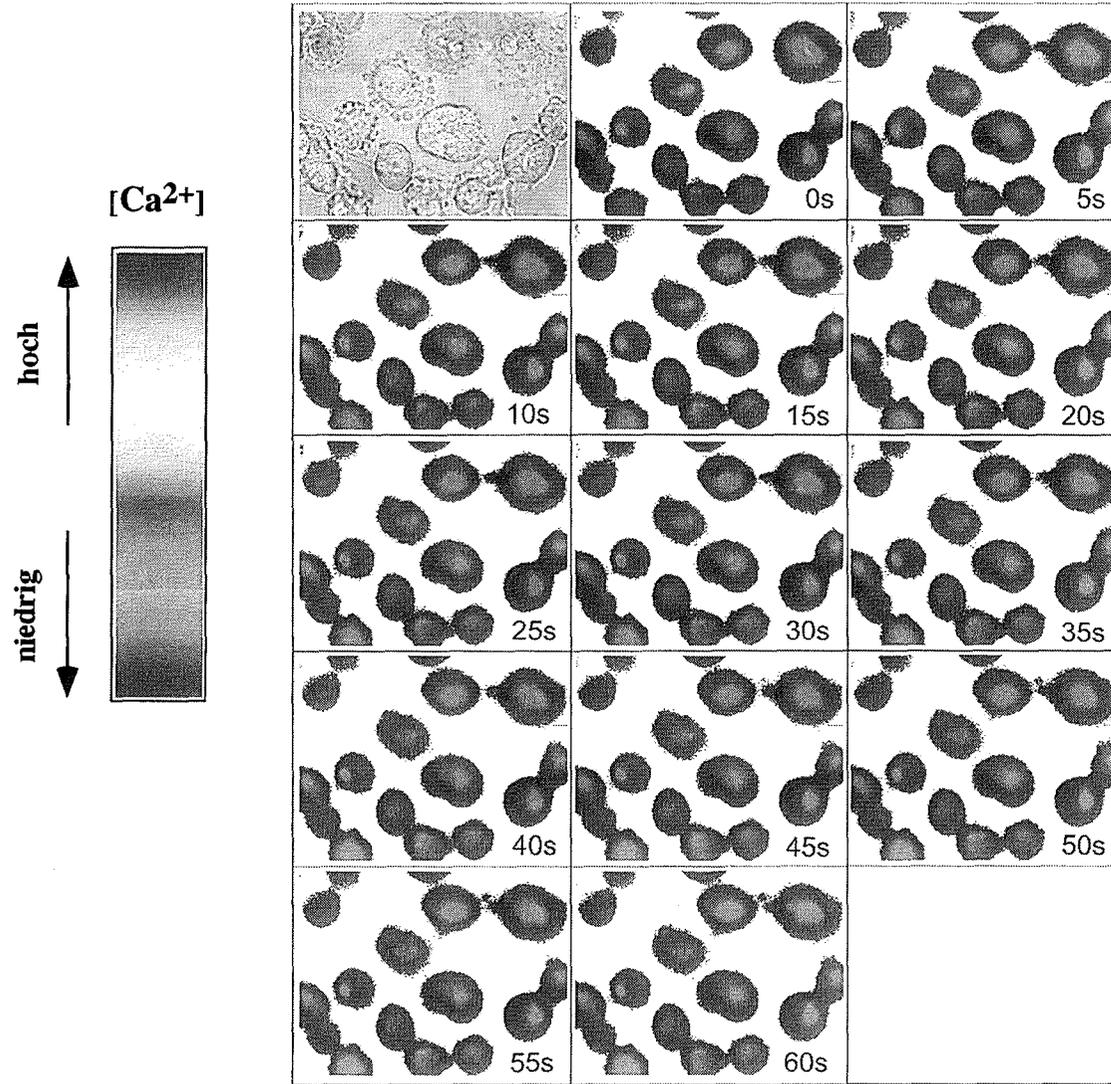
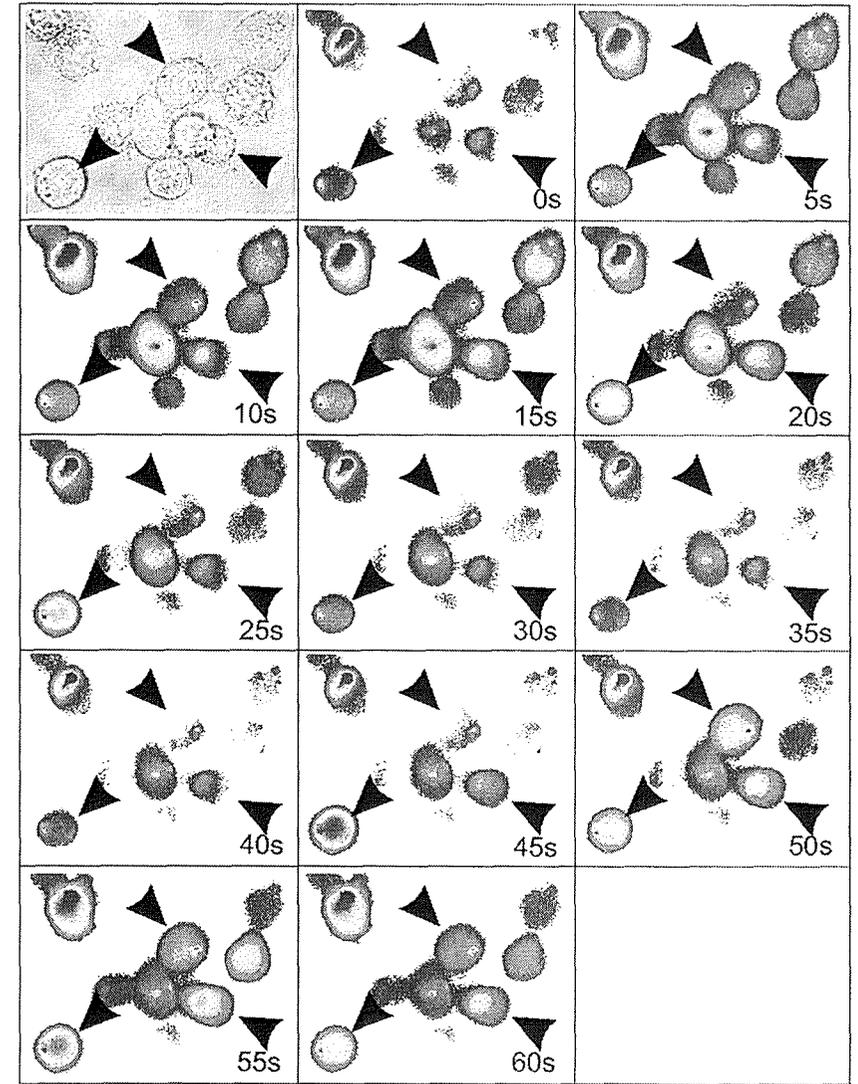
B PC3 AR_{wt}

Abb. 6: Androgenrezeptor-abhängige Erhöhung des Spiegels an freiem cytosolischem Calcium durch Dihydrotestosteron. Die Abbildung zeigt Videoaufnahmen der Veränderungen der Calciumkonzentration in PC3 LV- (A) und PC3 AR_w-Zellen (B) bei Behandlung der Zellen mit DHT. PC3 LV- und PC3 AR_w-Zellen wurden in einer Dichte von 10³ Zellen pro Kammer auf 8-Kammer Glasobjektträger ausplattiert und für 3 Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) inkubiert. 18 h vor der Farbstoffbeladung wurde das Medium durch RPMI ohne Phenolrot mit 0,5 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) ersetzt. Die Beladung der Zellen mit dem Farbstoff Fluo-3 (2 µM) erfolgte für 45 min in serumfreiem RPMI (10 mM HEPES, 4 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, pH 7,3 ohne Phenolrot) unter ständigem Schütteln bei 37 °C. Die Zellen auf den Objektträgern wurden direkt am Ölimmersionsmikroskop mit 0,1 nM DHT behandelt und die Veränderung der Calciumkonzentration als Fluoreszenzsignal mit einer automatischen Kamera während eines Gesamtzeitraums von 60 sec alle 5 sec aufgenommen. Die Abbildung zeigt diese Aufnahmen als Falschfarbenbilder, die Farbskala gibt die relative Höhe der Calciumionenkonzentration an.

Um die Unterschiede in der Fluoreszenzstärke zu verdeutlichen, wurden die Aufnahmen in Falschfarbenbilder umgewandelt. Die Höhe der Calciumionenkonzentration steigt dabei von blau (niedrigster Ca²⁺-Wert) nach rot (höchster Ca²⁺-Wert); weiß bedeutet, daß die Fluoreszenzstärke unter der Nachweisgrenze lag. Bei Behandlung mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine zeigten weder PC3 LV- noch PC3 AR_w-Zellen eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die mit dem leeren Vektorkonstrukt transfizierten Zellen zeigten eine etwas höhere Grundfluoreszenz, reagierten während des Beobachtungszeitraums jedoch nicht auf die Behandlung mit DHT (Abbildung 6 A). In den AR-exprimierenden Zellen resultierte die Behandlung mit einer DHT-Konzentration von 0,1 nM bereits nach 5 Sekunden in einer deutlichen Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration (Abbildung 6 B). Die Zunahme an freiem cytosolischem Calcium nach Behandlung der Zellen mit Androgen erfordert also die Anwesenheit des Androgenrezeptors. Die PC3 AR_w-Zellen sprachen alle auf die Androgenbehandlung an, es gab dabei jedoch individuelle Unterschiede. Bei einigen Zellen nahm die nach wenigen Sekunden DHT-induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration über den gesamten beobachteten Zeitraum von 1 min langsam wieder ab. Bei den meisten zeigte sich jedoch eine Calciumoszillation, welche in den in Abbildung 6 B durch Pfeile markierten Zellen besonders deutlich zu erkennen war.

3.2.2 Dihydrotestosteron führt zu einer zelltypspezifischen Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2

In vielen Zelltypen löst ein erhöhter cytoplasmatischer Calciumspiegel die Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen, im folgenden kurz als MAPkinasen oder MAPK bezeichnet, aus (Nel et al., 1990, Chao et al., 1992, Rosen et al., 1994). Diese MAPkinasen werden vor allem nach Stimulation spezifischer Zelloberflächen-Rezeptoren durch

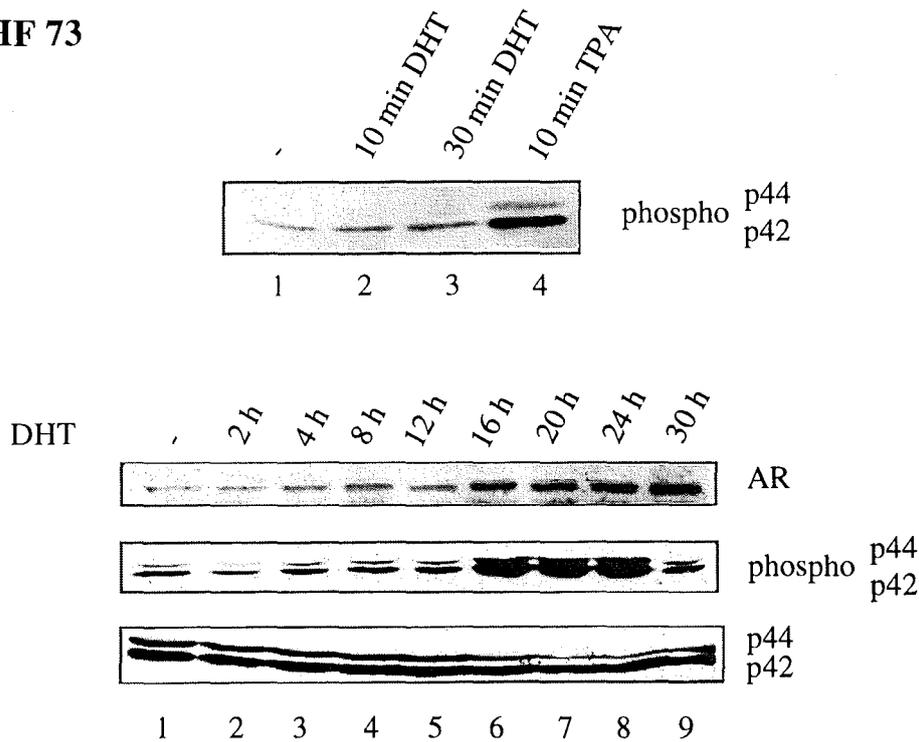
Wachstumsfaktoren über eine Kaskade von Proteinkinasen sehr schnell aktiviert (zur Übersicht siehe Cano & Mahadevan, 1995, Kortjenann & Shaw, 1995, Su & Karin, 1996).

Es gibt in jüngster Zeit Beobachtungen, daß auch Steroidhormone eine schnelle Aktivierung von MAPkinasen bewirken können (Migliaccio et al., 1996, Watters et al., 1997, Migliaccio et al., 1998). Im folgenden wurde darum untersucht, ob Androgene in der Lage sind, in AR-positiven Zellen solche MAPkinasen zu aktivieren. Dazu wurden zunächst Zellen betrachtet, welche endogen den Androgenrezeptor exprimieren. Zu diesem Zweck wurden primäre Genitalhautfibroblasten (VHF 73) und primäre glatte Muskelzellen der nicht pathologisch veränderten Prostata (PM 58) verwendet. Beide Zelltypen entstammen Biopsien von Patienten der Urologischen Abteilung der Universitätsklinik Innsbruck (Cronauer et al., 1998).

Die zuerst charakterisierte, am besten untersuchte der MAPkinasen ist die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*), welche in zwei Isoformen als p42 (ERK 2) und p44 (ERK 1), bezeichnet nach dem jeweiligen Molekulargewicht, vorkommt (Boulton et al., 1991, Ahn et al., 1991). Aktivierung von ERK 1 und 2 erfordert als unverzichtbare Voraussetzung die Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes, welche durch einen Glutaminsäurerest voneinander getrennt sind (Sturgill et al., 1988, Payne et al., 1991, zur Übersicht siehe Ahn et al., 1992). Diese Phosphorylierung kann durch Immunnachweis mittels *Western blot*-Analyse festgestellt werden. Es wurde untersucht, ob eine Behandlung der Zellen mit Androgen zur Phosphorylierung dieser MAPkinasen führt. Die Zellen wurden in allen Experimenten (falls nicht anders beschrieben) für zwei Tage in Anwesenheit von 3 % Aktivkohle-behandeltem Serum (CCS) kultiviert. Sechzehn Stunden vor der Hormonbehandlung wurde die CCS-Konzentration auf 0,5 % gesenkt, um die Proliferation der Zellen zu stoppen und eine möglichst geringe basale Phosphorylierung der MAPkinasen zu gewährleisten.

In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer *Western blot*-Analyse mit Extrakten von VHF73- und PM58-Zellen dargestellt, welche für unterschiedliche Zeiten mit Dihydrotestosteron behandelt oder unbehandelt gelassen wurden. Zur Sichtbarmachung der Phosphorylierung wurde ein Antikörper verwendet, welcher spezifisch nur die phosphorylierte Form der MAPkinasen ERK 1 und 2 erkennt.

A VHF 73



B PM58

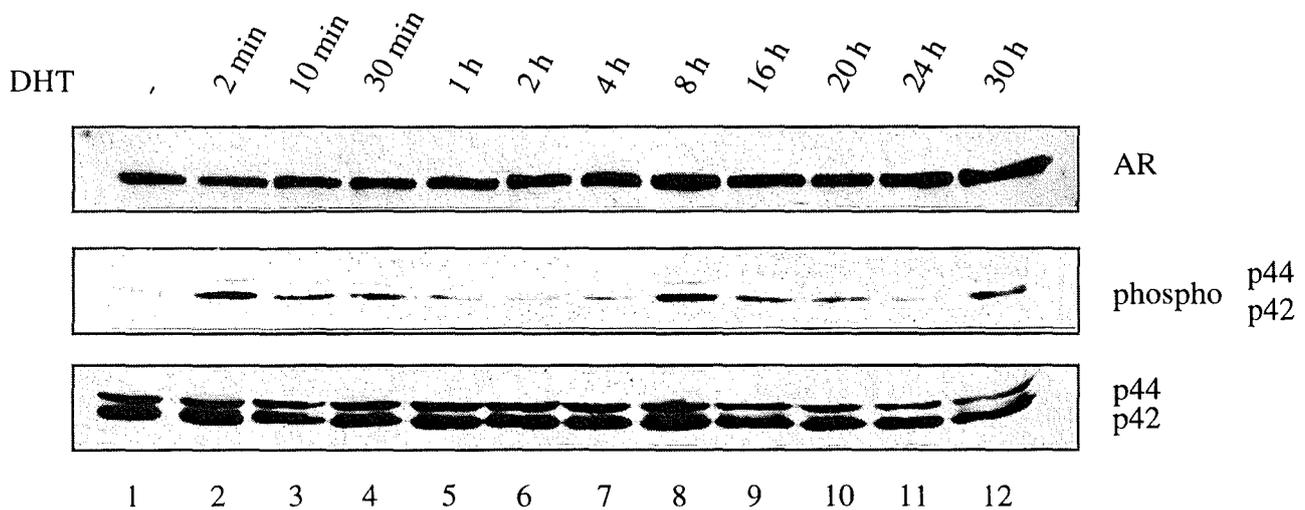


Abb. 7: Die DHT-Behandlung primärer Genitalhautfibroblasten und primärer glatter Muskelzellen der Prostata bewirkt eine Erhöhung der Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 mit unterschiedlicher Kinetik. Western blot-Analyse mit Extrakten aus VHF73- (A) und PM58-Zellen (B). Die Zellen wurden zwei Tage in DMEM mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion erfolgte ein Wechsel zu Medium mit 0,5 % CCS. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10^{-7} M DHT bzw. mit 80 ng/ml TPA behandelt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in einem 10 %

Ergebnisse

SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transferieren auf eine Membran wurden die verschiedenen Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

In der Abbildung dargestellt sind die Immunnachweise des AR (Antikörper: sp061, 1:1000, jeweils oberes Kästchen), der phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (Antikörper: phospho MAPK, 1:1000, phospho p42/p44, jeweils mittleres Kästchen) und von ERK 1/2 (anti-ERK 1-Antikörper, 1:1000, p42/p44, jeweils unteres Kästchen). Für VHF73-Zellen erfolgte bei kurzen Inkubationszeiten mit 100 nM DHT (0, 10 und 30 min) bzw. mit 80 ng/ml TPA (10 min) nur ein Immunnachweis von phosphorylierten ERK 1/2 (A, oben).

Es erwies sich, daß die Behandlung der beiden Zelltypen mit DHT tatsächlich zur Aktivierung der Proteinkinasen ERK 1 und ERK 2 führte. Dabei zeigte sich jedoch ein wesentlicher Unterschied zwischen den Genitalhautfibroblasten VHF73 (Abb. 7 A) und den glatten Muskelzellen prostatatischen Ursprungs (PM58, Abb. 7 B) in der Kinetik dieser Phosphorylierung (mittleres Kästchen, phospho p42/p44). Bei VHF73-Zellen trat nach 16 h eine deutliche Erhöhung der ERK-Phosphorylierung auf, welche nach 30 h wieder zurückging, aber nicht ganz auf den Wert unbehandelter Zellen reduziert wurde. In den PM58-Zellen war eine triphasische ERK-Aktivierung sichtbar. Nach 8 Stunden war die Phosphorylierung deutlich erhöht, dann nahm die Phosphorylierung ab und war nach 24 Stunden wieder beim Ausgangswert angelangt. Nach 30 Stunden war ein nochmaliger Anstieg der Phosphorylierung zu erkennen, möglicherweise gibt es also auch noch spätere Phasen der ERK-Aktivierung. Zusätzlich führte bei den PM58-Zellen bereits eine 2-minütige Induktion mit DHT zur erhöhten Phosphorylierung im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Auch diese nahm dann langsam ab und entsprach nach 2 Stunden wieder dem Wert der unbehandelten Zellen. In den Genitalhautfibroblasten VHF73 war eine solche schnelle Aktivierung nicht zu beobachten (siehe Abbildung 7 A, oben Spur 1-3 und unten, mittleres Kästchen Spur 1-3). Eine zehnminütige Kontrollbehandlung der Zellen mit dem Phorbolster TPA, welcher über eine Aktivierung von konventionellen Proteinkinase C (cPKC)-Isoformen zur Phosphorylierung von ERK 1 und 2 führt (Adams & Parker, 1991, Schönwasser et al., 1998), zeigte dagegen den erwarteten Effekt (Abb. 7A, oben, Spur 4). Die DHT-Behandlung hatte bei beiden Zelltypen keinen Einfluß auf die Menge an gesamtem ERK 1 und ERK 2 (siehe 7 A und 7 B unteres Kästchen, p42/p44), deshalb wurde im folgenden als Kontrolle der in den einzelnen Spuren eingesetzten Proteinmenge meist eine Hybridisierung der *Western blot*-Membran mit einem Antikörper gegen ERK 1, welcher auch ERK 2 erkennt, verwendet. Bei den PM58-Zellen war die ERK 1/2-Menge bei dem 8 Stundenwert (Abb. 7 B, unteres Kästchen, Spur 8) vermutlich aufgrund eines Unterschieds in der Menge an eingesetztem Zellextrakt etwas erhöht. Der Anstieg der ERK-Phosphorylierung ist jedoch deutlich stärker und deshalb nicht auf die erhöhte Proteinmenge zurückzuführen.

PM58- und VHF73-Zellen exprimieren endogen den Androgenrezeptor. Die Menge an AR-Protein wurde in den VHF73-Fibroblasten durch DHT-Behandlung zeitabhängig erhöht, während eine solche Zunahme der AR-Menge in PM58 nur schwach ausgeprägt war (vergleiche Abb. 4 A unten mit B, jeweils oberes Kästchen, AR). Die Kinetik dieser verstärkten Expression

entspricht jedoch nicht derjenigen der ERK-Phosphorylierung und ist deshalb vermutlich nicht für diesen Effekt verantwortlich.

Das späte Auftreten der ERK-Phosphorylierung in VHF73- bzw. des zweiten Hochpunkts in PM58-Zellen, ist vermutlich auf eine genomische Wirkung des Androgenrezeptors zurückzuführen. Die schnelle und transiente Aktivierung von ERK 1 und 2 in den prostatistischen glatten Muskelzellen ist dagegen ein bisher nicht beobachteter "nicht-klassischer" Androgeneffekt, welcher im weiteren genauer analysiert wurde. Dabei war vor allem die Frage der Rezeptorabhängigkeit zu klären. Um außerdem festzustellen, wie spezifisch dieser Effekt ist, wurde die Wirkung von DHT auf andere MAPkinasen untersucht.

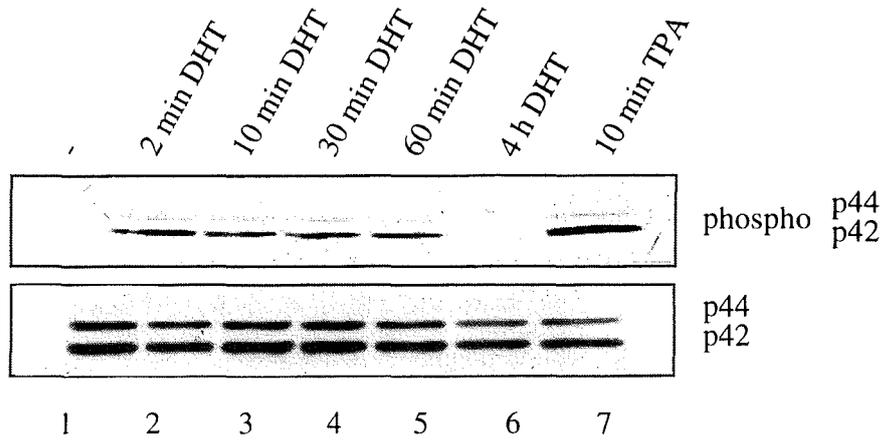
3.2.3 Die Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK 1 und ERK 2 durch den Androgenrezeptor ist subtypspezifisch

ERK 1 und ERK 2 sind Mitglieder einer Familie von mitogen-aktivierten Proteinkinasen, welche über parallele aber distinkte Signalketten, die als Antwort auf extrazelluläre Stimuli aktiviert werden, reguliert werden. Neben den ERKs gehören auch die cJun-N-terminalen Kinasen 1 und 2 (JNK 1 und JNK 2, auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen SAPK 1/2 bezeichnet, Derijard et al., 1994, Kyriakis et al., 1994) und die unter anderem durch osmotischen Stress aktivierte Kinase p38 (Han et al., 1994, Lee et al., 1994) zur MAPK-Gruppe von Serin/Threoninkinasen. Sie werden von dual-spezifischen MAPkinase Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Diese Phosphorylierung erfolgt jeweils an einem Threonin- und einem Tyrosinrest, welche durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind (Ray & Sturgill, 1987). Die verschiedenen MAPkinasen-Subtypen unterscheiden sich dabei in der Aminosäure zwischen den Phosphorylierungsstellen. Im weiteren wurde untersucht, ob auch Phosphorylierung dieser anderen MAPkinasen durch DHT beobachtet werden kann.

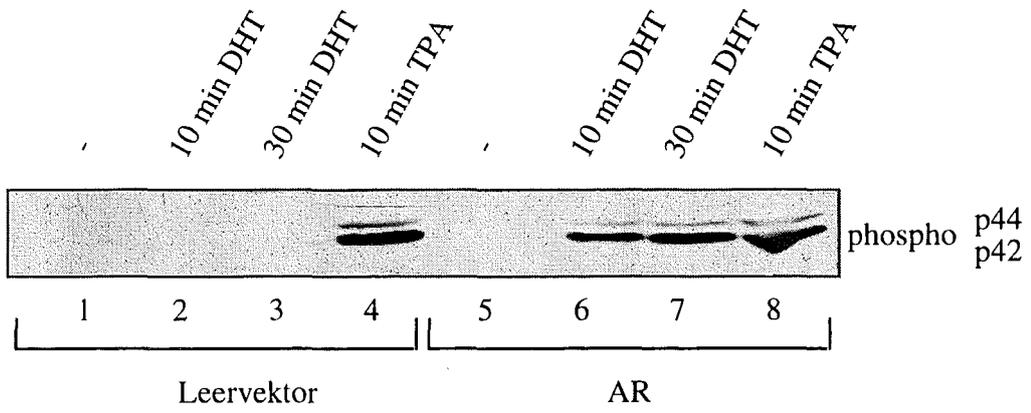
Um die Spezifität der schnellen Wirkung von Androgenen auf die verschiedenen Isoformen der mitogen-aktivierten Proteinkinasen zu analysieren, wurden die stabil den Wildtyp-AR exprimierenden PC3 AR_w Zellen für unterschiedliche Zeiten mit DHT behandelt und die Phosphorylierung der drei MAPkinase-Isoformen ERK 1/2, p38 und JNK 1/2 mittels Immunnachweis bestimmt. Dazu wurde wiederum die Verfügbarkeit von Antikörpern genutzt, welche nur die phosphorylierte Form der Proteinkinasen erkennen.

Ergebnisse

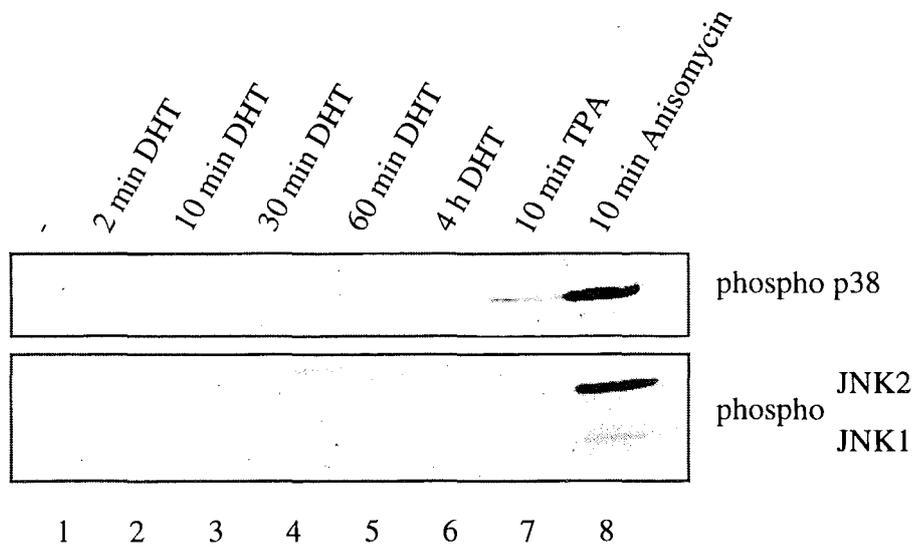
A



B



C



D LNCaP

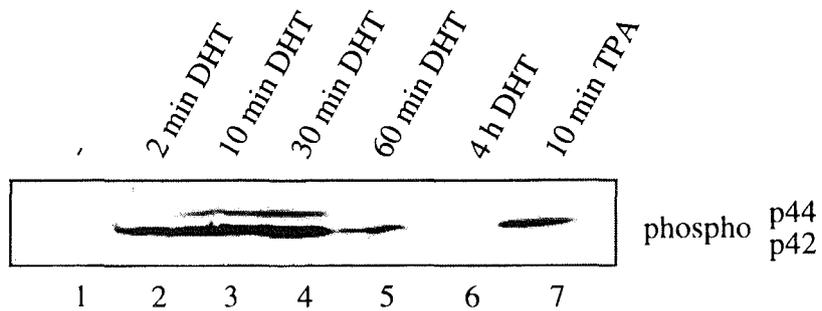


Abb. 8: DHT-abhängige Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 in Androgenrezeptor-positiven Prostatakrebszellen. (A) bis (C): DHT-vermittelte MAPK-Phosphorylierung erfordert die Anwesenheit des Androgenrezeptors und ist spezifisch für ERK 1 und ERK 2. *Western blot*-Analysen mit zellulären Extrakten von PC3-Zellen, welche stabil mit dem Wildtyp-AR oder einem leeren Vektorkonstrukt (B, linker Teil der Abbildung) transfiziert waren. Die Zellen wurden zwei Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion wurde ein Mediumwechsel zu RPMI mit 0,5 % CCS durchgeführt. Bei den in (A) und (C) dargestellten Experimenten wurden PC3 AR_{wt}-Zellen für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (jeweils Spur 1) oder für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT in Vehikel (0,1 % Ethanol) (Spuren 2-6) behandelt. Als Kontrolle erfolgte die Zugabe von TPA (80 ng/ml, Spur 7) oder Anisomycin (5 µg/ml, Spur 8 in C) für 10 min. Für die Untersuchung der Rezeptorabhängigkeit wurden in (B) PC3 LV und PC3 AR_{wt}-Zellen für 10 min (Spuren 2 und 6) oder 30 min (Spuren 3 und 7) mit 10⁻⁷ M DHT, für 10 min mit 80 ng/ml TPA (Spuren 4 und 8) oder für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spuren 1 und 5) behandelt.

(D) DHT-Behandlung von LNCaP-Prostatakarzinomzellen, welche einen endogenen AR exprimieren, führt ebenfalls zur transienten Phosphorylierung von ERK 1/2. *Western blot*-Experiment mit Extrakten aus LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion wurde ein Mediumwechsel zu RPMI mit 0,5 % CCS durchgeführt. Die Behandlung der Zellen erfolgte für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT (Spuren 2-6), für 10 min mit 80 ng/ml TPA (Spur 7) oder für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1).

Bei allen dargestellten Experimenten wurden die Zellen auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden die verschiedenen Proteine mit spezifischen Antikörpern (Verdünnung für alle Antikörper 1:1000) nachgewiesen. (A) Immunnachweise der phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44, oberes Kästchen) und von gesamtem ERK 1/2 (p42/p44, unteres Kästchen). (B) Immunnachweise der phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44) (C) Immunnachweise der phosphorylierten Formen von p38 (phospho p38, oberes Kästchen) und der cJun N-terminalen Kinasen 1 und 2 (phospho JNK 1/JNK 2, unteres Kästchen). (D) Immunnachweise der phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44).

Es zeigte sich, daß bereits nach zweiminütiger Behandlung der AR_{wt}-exprimierenden Zellen mit DHT die MAPKinasen ERK 1 und ERK 2 phosphoryliert werden (Abbildung 8 A, oberes Kästchen, Spuren 1-7). Dies entspricht der Beobachtung, welche bei den primären prostatistischen glatten Muskelzellen PM58 gemacht wurde (siehe Abbildung 7 B). Die Phosphorylierung blieb über 60 min bestehen, war aber nach 4 h nicht mehr nachweisbar. Eine TPA-Behandlung von 10 min bewirkte in diesen Zellen ebenfalls eine starke Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 (Abb. 8 A oberes Kästchen, Spur 8). Zur Kontrolle, ob die Behandlung der Zellen einen Einfluß auf die Gesamtexpression von ERK 1/2 hat, wurde die *Western blot*-Membran mit einem Antikörper, welcher die Gesamtmenge an ERK 1 und ERK 2 erkennt, hybridisiert. Es zeigte sich, daß die Proteinmenge der ERKs während des gesamten beobachteten Zeitraums unverändert bleibt (Abbildung 8 A, unteres Kästchen).

Um zusätzlich die Frage der Rezeptorabhängigkeit der ERK-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde die DHT-Antwort der AR-negativen PC3 LV- mit der von PC3 AR_w- Zellen bei paralleler Behandlung der Zellen verglichen. Das in Abbildung 8 B dargestellte *Western blot*-Experiment zeigt, daß die Phosphorylierung der MAPKinasen nach DHT-Behandlung der Zellen strikt abhängig von der Expression des klassischen AR ist. Während Behandlung der AR-positiven PC3 AR_w-Zellen mit DHT für 10 oder 30 min zur Phosphorylierung von ERK 1/2 führt, ist über den gleichen Zeitraum ein solcher Effekt in PC3 LV-Zellen nicht zu beobachten. TPA-Behandlung von 10 min bewirkt jedoch in AR-positiven und -negativen Zellen eine starke ERK-Phosphorylierung.

Die DHT-vermittelte Phosphorylierung ist spezifisch für ERK 1 und ERK 2, wie in Abbildung 8 C (unteres Kästchen) gezeigt, hat DHT keinen Effekt auf die Phosphorylierung der cjun-N-terminalen Kinasen JNK 1 und JNK 2 (p46 und p54). Ebenso bewirkt DHT keine Aktivierung der p38-MAPKinase oder allenfalls eine geringfügige nach 10 bzw. 30 minütiger Behandlung der Zellen (Abb. 8 C, oberes Kästchen, Spur 3 und 4). Eine Kontrollbehandlung der Zellen für 10 min mit Anisomycin führte jedoch zur Phosphorylierung von p38 bzw. JNK 1/2, was zeigt, daß diese Signalwege auch in PC3-Zellen funktionell sind, jedoch nicht androgen-abhängig aktiviert werden. Der Phorbolster TPA besitzt dagegen nur einen schwachen Effekt auf die Phosphorylierung von p38 und führt nicht zu einer Phosphorylierung der cJun-N-terminalen Kinasen. Diese Spezifität der MAPKinasen-Aktivierung entspricht den Beobachtungen, daß die Aktivierungsprofile der verschiedenen Isoformen durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli nicht identisch sind (zur Übersicht siehe Cano & Mahadevan, 1995, Karin, 1995, Kortgenjann & Shaw, 1995).

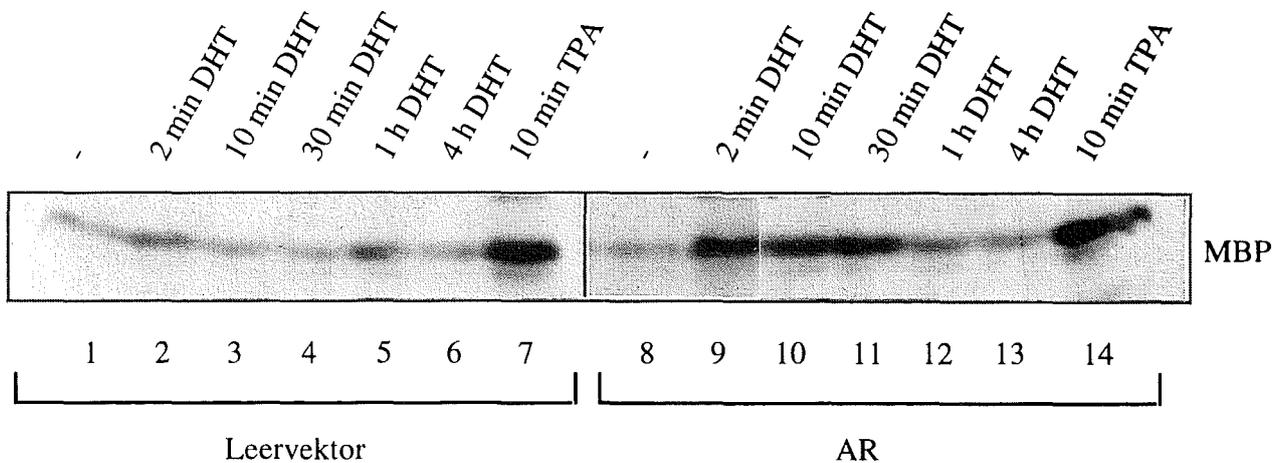
Da PC3-Zellen keinen endogenen Rezeptor enthalten, wurde der AR in diesen Experimenten stabil überexprimiert. Ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Zellen mit endogenem AR stellt neben den PM58-Zellen die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP dar. LNCaP-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit DHT behandelt und die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 bestimmt. Auch mit endogenem AR zeigte sich hier die bekannte Kinetik der MAPK-Aktivierung: Bereits nach 2 min waren ERK 1 und ERK 2 phosphoryliert, nach 30 min wird der höchste Wert erreicht und nach 4 Stunden war der Effekt verschwunden (Abb. 8 D).

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die DHT-vermittelte Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen eine Androgenrezeptor-abhängige Antwort darstellt. Der AR führt dabei spezifisch zur Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2, nicht aber anderer MAPKinasen. Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung auch ausreichend für ihre funktionelle Stimulation ist. Darum wurden im weiteren die *in vitro* Phosphorylierung eines ERK-Substrates sowie verschiedene Effektoren untersucht, welche durch ERK 1 und 2 aktiviert werden.

3.2.4 Funktionelle Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 durch Dihydrotestosteron

Die Aktivität von ERK 1 und 2 lässt sich anhand der Fähigkeit dieser Kinasen, *in vitro* das Myelin-basische Protein (MBP) zu phosphorylieren, nachweisen. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 durch DHT zur Aktivierung führt, wurde gesamtes ERK 1 und ERK 2 aus Extrakten von Hormon- und TPA-behandelten Zellen mittels des spezifischen ERK 1-Antikörpers (Santa Cruz), welcher auch für die *Western blot*-Experimente verwendet wurde, immunpräzipitiert. Dieser Antikörper ist in der Lage, ERK 1 und ERK 2 auch in der aktiven Form zu präzipitieren. Anschließend wurde in einem *in vitro*-Kinaseexperiment die Aktivität der ERKs durch Bestimmung der MBP-Phosphorylierung in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Adenosintriphosphat getestet. Nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel kann das phosphorylierte MBP durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis eines solchen Immunkomplex-Kinasetests mit Extrakten aus PC3 LV-, PC3 AR_{wt} und LNCaP-Zellen.

A PC3-Klone



B LNCaP

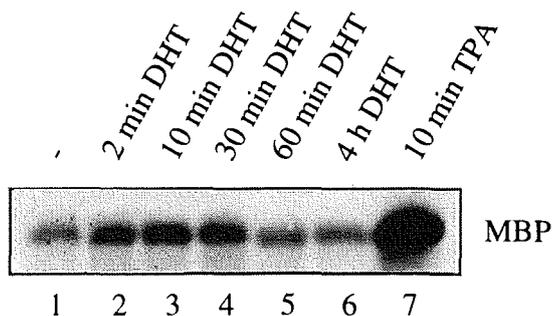


Abb. 9: Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 in DHT-behandelten AR-positiven Zellen führt zu ihrer funktionellen Aktivierung. DHT vermittelt die Phosphorylierung von Myelin-basischem Protein (MBP) durch ERK 1/2 in Anwesenheit des AR. (A) Immunkomplex-Kinasetest mit Zellextrakten aus PC3 LV- (Spuren 1-7) und PC3 AR_w-Zellen (Spuren 8-14). Die Zellen wurden zwei Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion wurde ein Mediumwechsel zu RPMI mit 0,5 % CCS durchgeführt. Die Behandlung erfolgte für die angegebenen Zeiten mit 10⁻⁷ M DHT (Spuren 2-6 und 9-13) oder für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spuren 1 und 8) oder 80 ng/ml TPA (Spuren 7 und 14). (B) Immunkomplex-Kinasetest mit Zellextrakten aus LNCaP-Zellen, welche zwei Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert wurden. 16 h vor der Hormoninduktion wurde ein Mediumwechsel zu RPMI mit 0,5 % CCS durchgeführt. Die Behandlung der Zellen erfolgte für die angegebenen Zeiten mit 10⁻⁷ M DHT (Spuren 2-6) oder für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1) oder 80 ng/ml TPA (Spur 7). (A) und (B): Anschließend an die Behandlung mit den Induktoren wurden die Zellen lysiert und Gesamt-ERK 1/2 aus Extrakten mit gleichen Mengen Protein wurde mit Hilfe eines an Protein A-Sepharose gekoppelten anti-ERK1 Antikörpers (1:100) immunpräzipitiert. Die *in vitro* Kinasereaktion erfolgte durch Inkubation der an der Protein A-Sepharose präzipitierten Proteine mit 5 µg Myelin-basischem Protein (MBP) und 1 µl ³²PγATP in einem Endvolumen von 50 µl Kinasepuffer für 30 min bei 30°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12,5 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden auf 15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen elektrotransferiert. Die Abbildung zeigt die Autoradiographien der Membranen.

Eine Kontrollbehandlung mit TPA induzierte bei beiden PC3-Zellklonen sowie bei LNCaP-Zellen eine starke Erhöhung der MBP-Phosphorylierung. Eine *in vitro*-Phosphorylierung von MBP in Anwesenheit von Androgen war jedoch nur in den AR-positiven PC3 AR_w- und LNCaP-Zellen, nicht jedoch in den Leervektor-transfizierten PC3-Zellen, zu beobachten. Der Zeitablauf der DHT-induzierten Substratphosphorylierung ähnelte dabei derjenigen der ERK-Phosphorylierung in diesen Zellen. In den Ansätzen mit Extrakten aus Zellen, welche für 2, 10 und 30 min mit DHT behandelt waren, zeigte sich eine deutliche Zunahme der *in vitro*-Kinaseaktivität der immunpräzipitierten ERKs, jedoch nicht bis auf das Niveau der TPA-induzierten Aktivität. Der Einbau an radioaktiv markiertem Phosphat ging nach 1 h wieder auf den Ausgangswert zurück. DHT-Behandlung bewirkt also nicht nur die Phosphorylierung, sondern auch die funktionelle Aktivierung von ERK 1 und ERK 2. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die androgen-induzierte Aktivierung der MAPkinasen ERK 1/2 ein allgemeines Merkmal von AR-positiven Prostatatumorzellen ist. Die Aktivierung der MAPkinasen ist dabei ebenso transient, wie die beobachtete Phosphorylierung. Es gibt jedoch Unterschiede von geringem Ausmaß in der Kinetik, deren Gründe bisher nicht bekannt sind.

Führt die DHT-vermittelte Phosphorylierung von ERK auch zu einer Weiterleitung des Signals? ERK 1 und ERK 2 sind als Serin/Threoninkinasen in der Lage, selbst verschiedene cytoplasmatische Proteine, wie zum Beispiel die Phospholipase A2, zu phosphorylieren (Hazan et al., 1997, Milella et al., 1997). Aktivierung der ERKs führt jedoch auch zu ihrer Translokation in den Zellkern, wo sie die Aktivität spezifischer Effektoren regulieren können (Gupta & Davis, 1994, Mao et al., 1996). Der zur Familie der Ets-Faktoren gehörende Transkriptionsfaktor Elk-1 ist ein solches gut untersuchtes, direktes Substrat der ERKs (Marais et al., 1993, Gille et al., 1995a, Price et al., 1996, Yang et al., 1998). Die MAPkinasen erhöhen die transkriptionelle Aktivität des Effektormoleküls Elk-1 durch Phosphorylierung mehrerer Phosphoakzeptorstellen im Carboxyterminus, welche für die Transaktivierung notwendig sind, nach Bindung an benachbarte „Andockstellen“ (Marais et al., 1993, Zinck et al., 1993). Um die Aktivität von Elk-1 in Gegenwart von Androgen zu bestimmen, wurde ein Fusionskonstrukt aus der DNA-Bindedomäne (DBD) des Hefe-Gal4-Transkriptionsfaktors und Elk-1 (Gille et al., 1995b) transient mit einem Reporterkonstrukt, bestehend aus fünf Gal4-Bindestellen vor einem Luciferase-Indikatorgen (Kamano et al., 1995), in PC3 AR_{wt}- bzw. als Kontrolle in PC3 LV-Zellen cotransfiziert. Die Zellen wurden mit DHT oder epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) behandelt oder unbehandelt gelassen und die Luciferaseaktivität des Reportergens bestimmt. EGF wurde als Positivkontrolle verwendet, da es einer der wichtigsten extrazellulären Induktoren der ERK/MAPkinasekaskade ist (Ahn et al., 1991). In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente dargestellt.

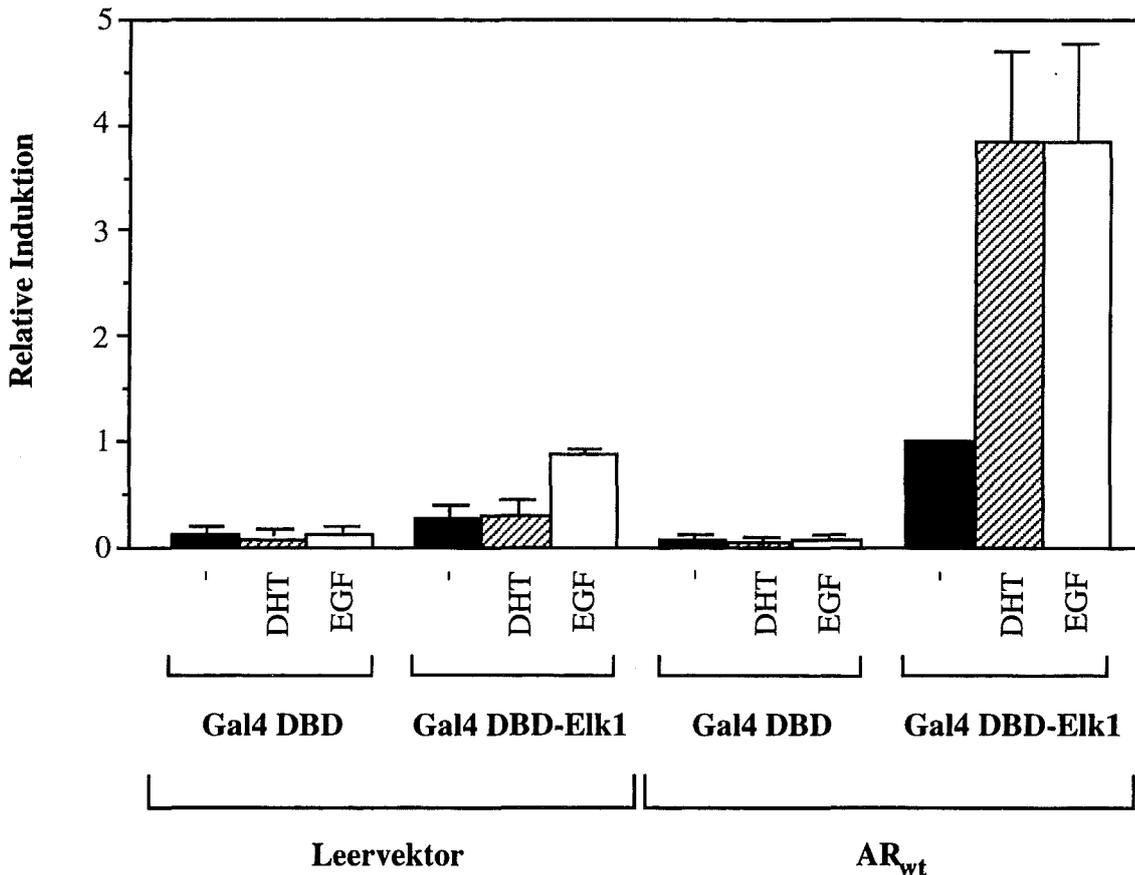


Abb. 10: Der Transkriptionsfaktor Elk-1 wird durch DHT-Behandlung von PC3 AR_{wt}-Zellen aktiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen für 2 Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert. Jeweils eineinhalb Millionen PC3 LV- und PC3 AR_{wt}-Zellen pro Schale wurden in DMEM mit 3 % CCS transient mit 1 µg der Gal4-DBD alleine (pSG424) oder als Fusionsprodukt mit Elk-1 (pSG Gal4-Elk1) und 9 µg eines Gal4-Luziferase Konstrukts (pG5.E4Δ38 lux3) cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 h in RPMI mit 3 % CCS, anschließend für 16 h in RPMI mit 0,5 % CCS inkubiert. Die Behandlung erfolgte für 6 h mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (gepunktete Balken), mit 100 nM DHT (gestreifte Balken) oder mit 5 ng/ml EGF (weiße Balken). Die Zellen wurden geerntet, auf Eis lysiert und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferaseaktivität von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Das Säulendiagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten Luciferaseaktivitäten aus fünf unabhängigen Experimenten dar. Diese Aktivität wurde im Falle der Basalaktivität des Reporters in Anwesenheit des Fusionsproteins aus Gal4-DBD und Elk-1 dem Wert 1 gleichgesetzt. Alle anderen Werte wurden relativ dazu ausgedrückt.

Die Behandlung der AR_{wt}-exprimierenden PC3-Zellen mit DHT oder mit EGF für 6 Stunden resultierte jeweils in einer etwa vierfachen Aktivierung des Gal4-Reportergens bei gleichzeitiger Expression des Gal4-Elk-1-Konstrukts. Coexpression der Gal4-DBD alleine führte jedoch nicht zur Induktion des Reporters in Anwesenheit von Hormon oder Wachstumsfaktor, was darauf hinweist, daß Aktivierung von Elk-1 für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Die uninduzierte Aktivität des Reporters ist bei Cotransfektion des Gal4-Elk-1 Konstrukts in PC3 AR_{wt}-Zellen höher als die in Gegenwart der Gal4-DBD alleine. Vermutlich ist dies auf eine geringe Konzentration an Androgen im Medium zurückzuführen, da in den AR-negativen PC3

LV-Zellen die Aktivität des Gal4-Reportergens in Anwesenheit der Gal4-DBD alleine nur geringfügig niedriger war, als die in Anwesenheit des Gal4-Elk-1 Fusionsproteins. In diesen Zellen hatte DHT-Behandlung keinen Einfluß auf die Luciferase-Enzymaktivität, während Kontrollbehandlung mit EGF zu einer etwa dreifachen Induktion führte. DHT-Behandlung bewirkt also eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von Elk-1 in AR-exprimierenden Zellen.

Der Transkriptionsfaktor Elk-1 bindet als *ternary complex factor* (TCF) gemeinsam mit dem *serum response factor* (SRF) an das sogenannte *serum response element* (SRE) im Promotor des c-fos-Protoonkogens und führt damit zu dessen transkriptioneller Aktivierung (Gille et al., 1995a, Treisman, 1996). Untersuchung der Expression des c-fos-Gen ist darum geeignet, um festzustellen, ob die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung zur Aktivierung eines endogenen Zielgens führt. In einem weiteren Ansatz zur Bestimmung der ERK-Aktivität wurde deshalb in einem *Northern blot*-Experiment mit poly (A)⁺-RNA aus DHT-behandelten LNCaP-Zellen untersucht, welchen Effekt das Hormon auf die endogene Expression des c-fos Gens hat.

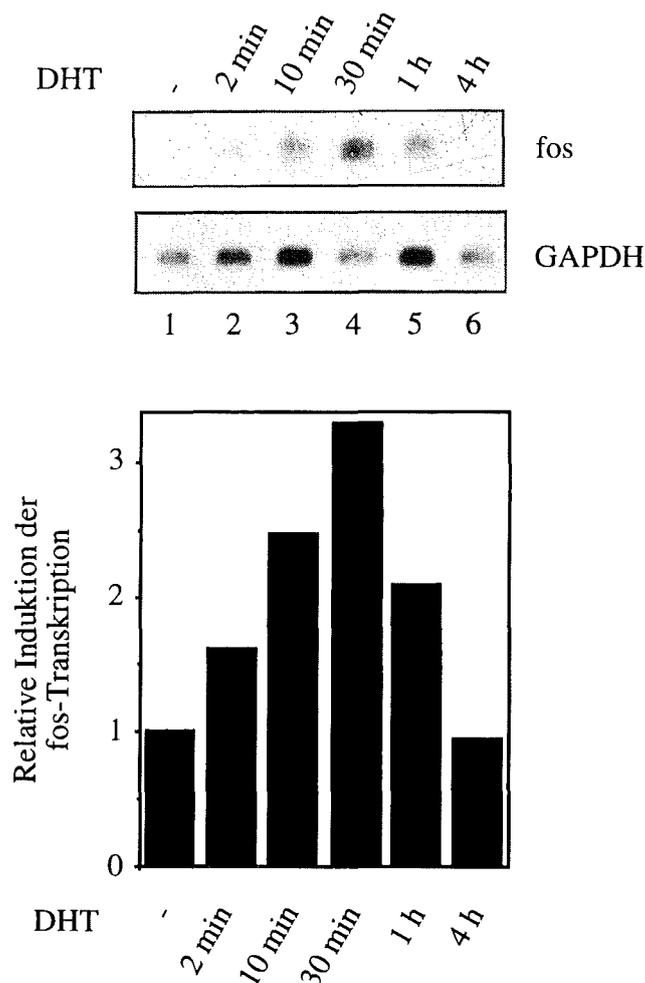


Abb. 11: Dihydrotestosteron erhöht die Transkription des endogenen c-fos-Gens in LNCaP-Prostatakarzinomzellen. Northern blot-Analyse mit RNA aus LNCaP-Zellen. LNCaP-Zellen wurden für 3 Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) bis zur Konfluenz kultiviert und 16 Stunden vor der Hormoninduktion in RPMI mit 0,5 % CCS gehungert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT (Spur 2-6) oder für 10 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine behandelt. Jeweils 10 µg poly (A)⁺ RNA aus diesen Zellen wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Northern blot wurde mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten hybridisiert, welche für das virale fos- bzw. das menschliche Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gen spezifisch sind. Die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde erfolgte zur Kontrolle der Menge der aufgetragenen RNA. Im Säulendiagramm (unten) wurde die Induktion des c-fos-Gens normalisiert auf die Menge an aufgetragener RNA, gemessen als Quantität des GAPDH-Transkripts, angegeben. Die relative uninduzierte Transkription von c-fos wurde dabei dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Auswertung der Signale erfolgte densitometrisch mit Hilfe eines Phosphoimager (PhosphoImager, Fujix BAS 1000).

Wie Abbildung 11 zeigt, bewirkt DHT in LNCaP-Zellen eine transiente Erhöhung der Transkription des c-fos-Gens. Das Balkendiagramm zeigt die Auswertung der Stärke der Induktion durch DHT, normalisiert auf die Menge an Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-RNA als Kontrolle (Abb. 11 oben, unteres Kästchen). Die

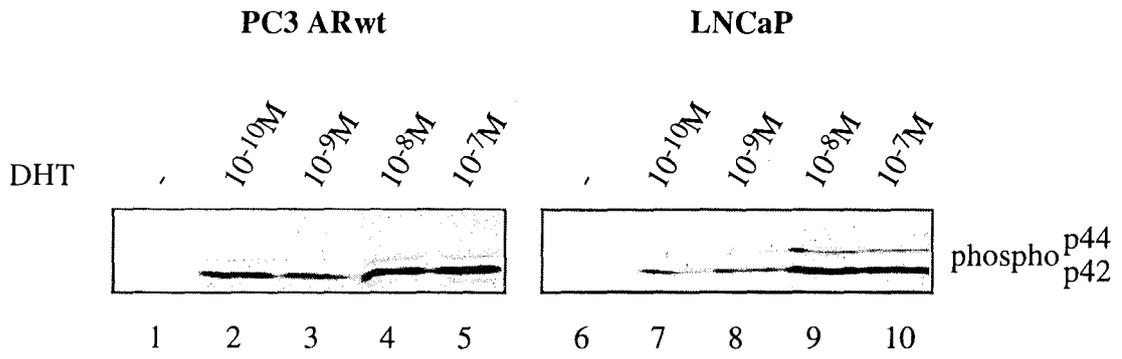
Induktion der c-fos-Expression folgt wiederum der gleichen Kinetik wie die zuvor beschriebene Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 in LNCaP- und in PC3 AR_{wt}-Zellen.

Zusammengefaßt lassen die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse den Schluß zu, daß die androgeninduzierte Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 in Androgenrezeptor-positiven Zellen zu einer verstärkten Expression des endogenen *immediate early* Gens c-fos führen. Um auszuschließen, daß dennoch ein klassischer Transaktivierungsmechanismus des AR an diesen Prozessen beteiligt sein könnte, wurden die Anforderungen der ERK-Phosphorylierung an die Androgenkonzentration und die Hemmbarkeit des DHT-Effekts durch Antiandrogene untersucht.

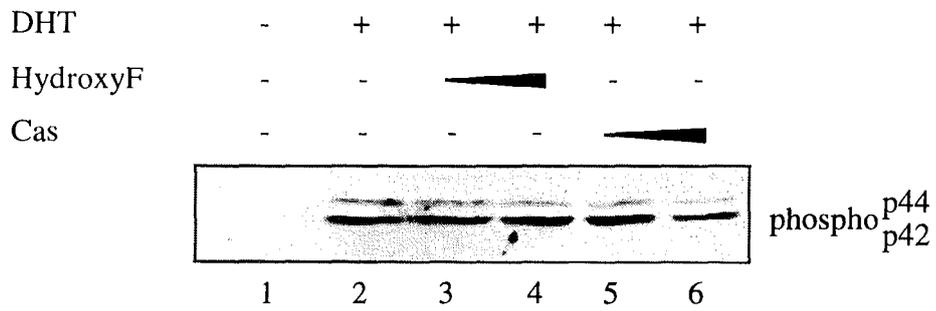
3.2.5 Antiandrogene wirken als Agonisten bei der Androgenrezeptor-vermittelten ERK-Aktivierung

Die klassische Transaktivierung durch den AR erfolgt konzentrationsabhängig mit einer sigmoiden Dosis-Wirkungs-Relation zwischen 100 pM und 100 nM und einer halbmaximalen Induktion bei einer Konzentration von 300 pM (Cato et al., 1987). Um die Wirkung verschiedener Konzentrationen an Androgen auf die ERK-Aktivierung in AR-positiven Zellen zu testen, wurden PC3 AR_{wt}- und LNCaP-Zellen mit DHT in Dosen von 100 pM bis 100 nM behandelt oder unbehandelt gelassen. Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 wurde wiederum in einem *Western blot*-Experiment anhand des Nachweises ihrer Phosphorylierung bestimmt.

A



B



C

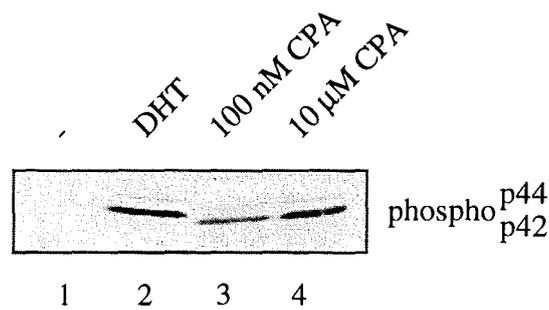
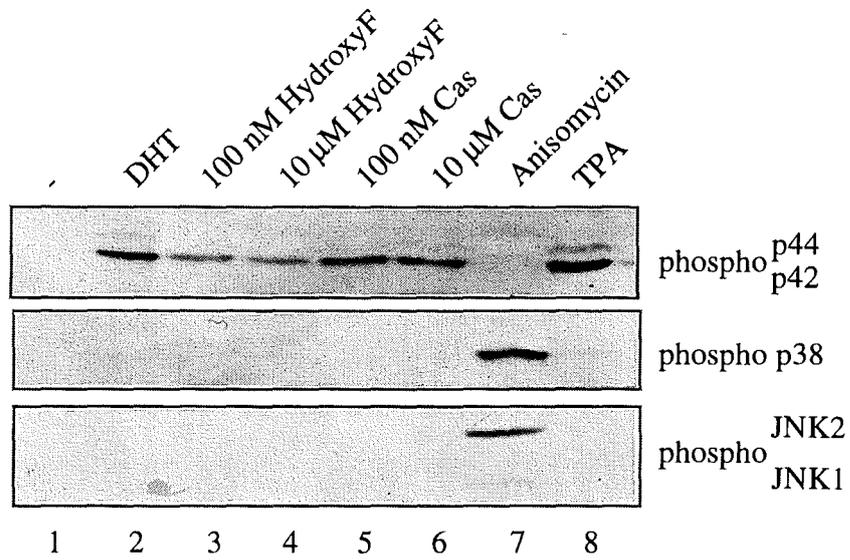


Abb. 12: Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 durch Androgene und Antiandrogene in AR-positiven Zelllinien. (A) Dosisabhängigkeit der DHT-Antwort. *Western blot*-Experiment mit Extrakten aus PC3 AR_w⁻ und LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden für 30 min mit steigenden Konzentrationen an DHT (0,1 bis 100 nM, Spuren 2-5 und 7-10) oder Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine behandelt. (B) Antiandrogene können die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung nicht hemmen. *Western blot*-Analyse mit Extrakten aus PC3 AR_w⁻ Zellen, welche für 30 min mit 100 nM DHT allein (Spur 2), mit DHT und 100 nM (Spur 3) oder 10 µM Hydroxyflutamid (HydroxyF, Spur 4), mit DHT und 100 nM (Spur 5), 10 µM (Spur 6) Casodex (Cas) oder mit 0,1 % Ethanol (Spur 1) behandelt wurden. (C) Auch Antiandrogene führen zur Phosphorylierung von ERK 1/2, aber nicht p38 oder JNK 1/2. **oben:** Phospho-MAPK Immunnachweise von ERK 1/2, p38 und JNK 1/2 mit Extrakten aus PC3 AR_w⁻-Zellen. Die Zellen wurden für 30 min mit 100 nM DHT, 100 nM (Spur 3) oder 10 µM Hydroxyflutamid (Spur 4), mit 100 nM (Spur 5) oder 10 µM (Spur 6) Casodex oder mit 0,1 % Ethanol (Spur 1) behandelt. Als Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit 5 µg/ml Anisomycin (Spur 7) und 80 ng/ml TPA (Spur 8) für jeweils 10 min. **unten:** Phospho-ERK 1/2 Immunnachweis mit Extrakten aus PC3 AR_w⁻-Zellen, welche für 30 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1), 100 nM DHT (Spur 2) oder mit 100 nM (Spur 3) oder 10 µM Cyproteronacetat (CPA, Spur 4) behandelt wurden.

Wie in Abbildung 12 A gezeigt ist auch die Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 bei beiden Zelltypen abhängig von der DHT-Konzentration. Der Effekt ist bereits bei einer DHT-Konzentration von 100 pM zu erkennen, wird dosisabhängig stärker und erreicht den höchsten Wert bei der höchsten verwendeten Konzentration von 100 nM. Diese Dosisabhängigkeit entspricht also derjenigen der Transaktivierungsfunktion des AR als Transkriptionsfaktor im Zellkern in Gegenwart von DHT. Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit alleine kann also einen genomischen Effekt nicht ausschließen, im folgenden wurde deshalb die Wirkung von Antihormonen betrachtet.

Antiandrogene wie Hydroxyflutamid und Casodex können die hormoninduzierte Transaktivierung durch den Wildtyp-Rezeptor hemmen (Cato et al., 1987, Berrevoets et al., 1993). Es stellte sich daher die Frage, welche Wirkung sie auf die DHT-vermittelte Phosphorylierung der MAPkinasen ERK 1 und ERK 2 besitzen. PC3 AR_w⁻-Zellen wurden simultan mit DHT und mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Antiandrogene behandelt. Weder Hydroxyflutamid noch Casodex konnten, in niedriger (100 nM) oder hoher Konzentration (100 µM) angewandt, die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung hemmen (Abb. 12 B, vergleiche Spuren 3 und 4 mit Spur 2, bzw. Spuren 5 und 6 mit Spur 2).

Ergebnisse

Um eine Erklärung für diese fehlende antagonistische Wirkung zu finden, wurde der Effekt einer Induktion durch Antiandrogene alleine untersucht. Es zeigte sich, daß alle verwendeten Antiandrogene bei einer Konzentration von 100 nM selbst schon die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 vermittelten (Abb. 12 C oben, oberes Kästchen). Dies gilt auch für das Antiandrogen Cyproteronacetat (CPA, Abb. 12 C unten), welches bezüglich Transaktivierung ein partieller Agonist ist, da es, wenn auch in geringerem Maße als DHT, die Expression androgen-abhängiger Gene induzieren kann (Kempainen et al., 1992). Auch der Antiandrogen-vermittelte AR-Effekt erwies sich als spezifisch für ERK 1/2, die JNKinasen und p38 konnten durch Behandlung der PC3 AR_w-Zellen mit Hydroxyflutamid und Casodex nicht phosphoryliert werden (Abb. 12 C oben, mittleres und unteres Kästchen).

Die agonistische Funktion der drei verwendeten Antiandrogene zeigte sich auch in der Aktivierung von Elk-1. Um die Aktivität von Elk-1 in Gegenwart von Antiandrogenern zu bestimmen, wurde wiederum das Gal4-Elk-1-Fusionskonstrukt transient mit dem Gal4-Luciferasereporterkonstrukt in PC3 LV- und PC3 AR_w-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden für 6 Stunden mit DHT bzw. Antiandrogenern jeweils in einer Konzentration von 100 nM behandelt oder unbehandelt gelassen. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente dargestellt.

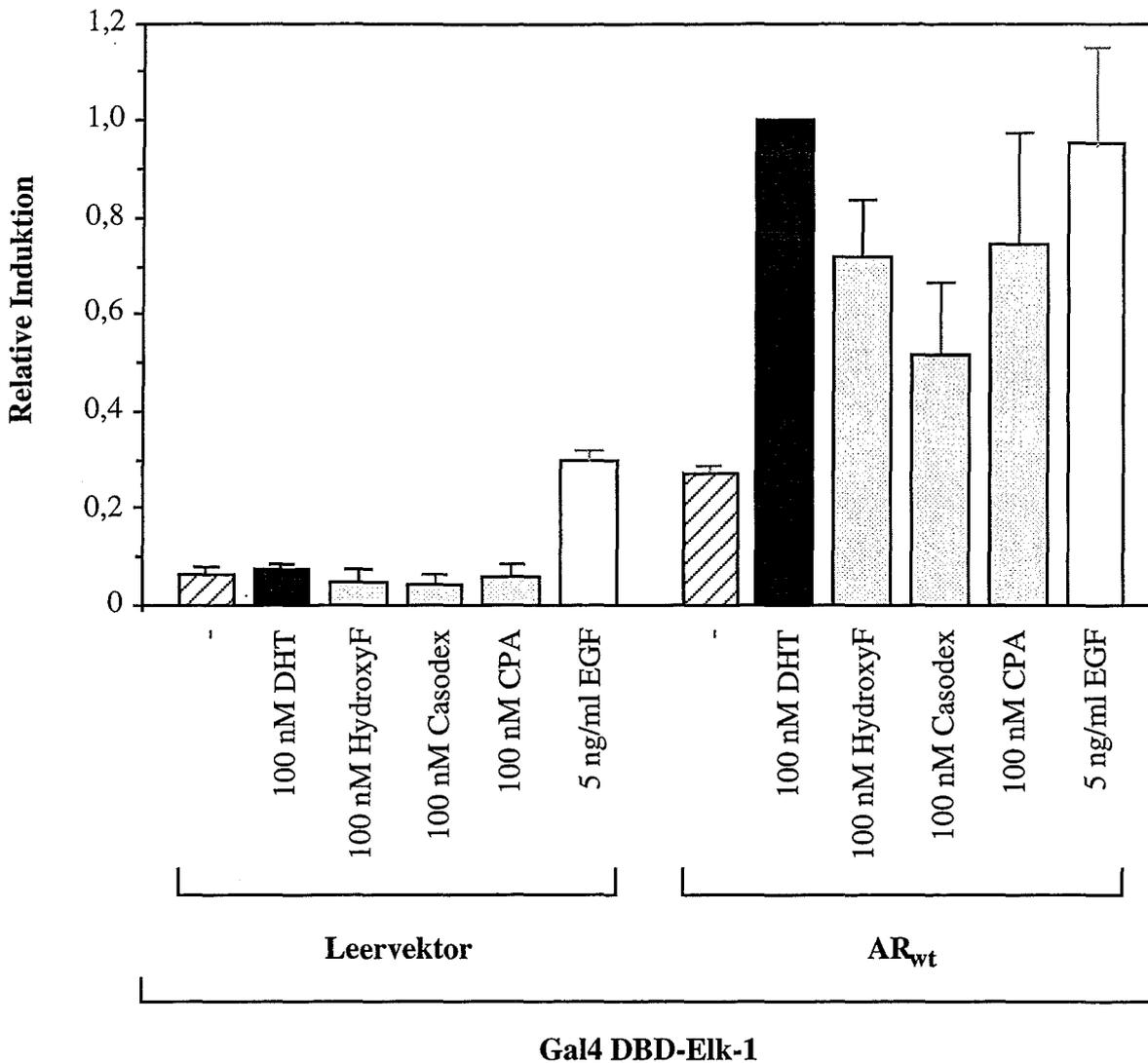


Abb. 13: Antiandrogen-Behandlung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1. Vor der Transfektion wurden die Zellen für 2 Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert. Jeweils eineinhalb Millionen PC3 LV und PC3 AR_{wt}-Zellen pro Schale wurden in DMEM mit 3 % CCS transient mit 1 µg des Fusionskonstrukts aus Gal4-DBD mit Elk-1 (pSG Gal4-Elk1) und 9 µg eines Gal4-Luziferase Konstrukts (pG5.E4Δ38 lux3) cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 h in RPMI mit 3 % CCS, anschließend für 16 h in RPMI mit 0,5 % CCS inkubiert. Die Behandlung erfolgte für 6 h mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (gestreifte Balken), mit 100 nM DHT (schwarze Balken), mit jeweils 100 nM der Antiandrogene Hydroxyflutamid (HydroxyF), Casodex oder Cyproteronacetat (CPA) (graue Balken) oder mit 5 ng/ml EGF (weiße Balken). Die Zellen wurden geerntet, auf Eis lysiert und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferaseaktivität von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Das Säulendiagramm stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der induzierten Luciferaseaktivitäten aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Diese Aktivität wurde im Falle der DHT-induzierten Aktivität des Reporters in PC3 AR_{wt}-Zellen in Anwesenheit des Fusionsproteins aus Gal4-DBD und Elk-1 dem Wert 1 gleichgesetzt. Alle anderen Werte wurden relativ dazu ausgedrückt.

Der DHT-induzierten Aktivität des Gal4-Luziferase Indikatorplasmids in PC3 AR_{wt}-Zellen, welche das Gal4-Elk-1 Fusionskonstrukt coexprimierten wurde der Wert 1 zugeordnet, alle anderen Werte sind relativ dazu ausgedrückt. Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten (Kapitel 3.1.1) ist die basale Aktivität des Gal4-Reporters in PC3 AR_{wt}-Zellen ca. dreimal höher als in den Leervektor-transfizierten PC3-Zellen. Dies ist möglicherweise auf eine geringfügige Menge an Androgen im Medium zurückzuführen. In Anwesenheit des Androgenrezeptors betrug die antiandrogen-induzierte Reporteraktivität in Gegenwart von Hydroxyflutamid und Cyproteronacetat etwa 70 %, für Casodex etwa 50 % der DHT-Induktion. In PC3 LV-Zellen zeigten die Antiandrogene dagegen keinen Effekt. Dies schließt eine androgenrezeptor-unabhängige Aktivierung von Elk-1 durch Antiandrogene aus. Obwohl sie also in der Lage sind, die Transaktivierung durch den Wildtyp-AR zu hemmen, können die Antihormone die funktionelle ERK-Aktivierung nicht verhindern.

Daß die Antiandrogene bei dieser AR-Wirkung alle selbst als Agonisten wirkten, erklärt auch, weshalb sie nicht in der Lage waren, die DHT-induzierte Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 zu hemmen. Sie verändern jedoch nicht die Spezifität der MAPKinasen-Phosphorylierung durch den Androgenrezeptor für ERK 1 und ERK 2. Um einen positiven regulatorischen Einfluß auf die Aktivität des AR_{wt} als Transkriptionsfaktor im Zellkern auszuüben, sind wie in Abschnitt 3.1 gezeigt, hohe Antiandrogenkonzentrationen (für Transaktivierung im Bereich von 100 µM, für Transrepression von mindestens 1 µM) notwendig. Durch die Wirkung der Antiandrogene als Agonisten der ERK-Aktivierung in niedrigen Konzentrationen kann also vermutlich ein genomischer Effekt ausgeschlossen werden. Eventuell handelt es sich bei dieser hier beschriebenen Androgenwirkung demnach um eine cytoplasmatische Funktion des AR. Die Untersuchung verschiedener Androgenrezeptormutanten könnte Licht auf die Bedeutung dieses nicht-genomischen AR-Effekts werfen.

3.2.6 Auswirkung von natürlich vorkommenden Androgenrezeptormutationen auf die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2

Mutationen des AR werden mit verschiedenen pathophysiologicalen Erscheinungen in Verbindung gebracht (zur Übersicht siehe Quigley et al., 1995). Im folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen solche natürlich vorkommenden AR-Mutationen auf die androgen- und antiandrogen-vermittelte MAPKinasen-Phosphorylierung haben. Die dafür verwendeten Mutationen waren a) Mutationen in der Hormonbindedomäne, welche aus Prostatatumoren isoliert wurden, b) eine Mutation in der N-terminalen Region, die bei bulbärer

und spinaler Muskelatrophie (SBMA) auftritt und c) eine Mutation in der DNA-Bindedomäne, welche bei einem Patienten mit komplettem Androgeninsensitivitätssyndrom gefunden wurde.

3.2.6.1 Mutationen in der Hormonbindedomäne

Die Mutation in der Hormonbindedomäne des AR in LNCaP-Zellen (Veldscholte et al., 1990, Fenton et al., 1997) und die bei Prostatakrebspatienten gefundenen somatischen Mutationen AR V715M und AR V730M (siehe Abschnitt 3.1), verändern die Funktion dieser Rezeptoren. Sie führen zu einer im Vergleich mit dem Wildtyp-AR stärkeren Transaktivierung in Anwesenheit von Antiandrogenen. Die antiandrogen-induzierte Transrepression entspricht dagegen jedoch derjenigen, welche durch Agonisten erzielt wird. Es stellte sich daher die Frage, ob es auch bei der ERK-Phosphorylierung als Antwort auf Hydroxyflutamid oder Casodex einen Unterschied zwischen Wildtyp-AR und diesen Rezeptormutanten gibt.

Um dies untersuchen zu können, wurden PC3-Zellklone hergestellt, welche stabil die cDNAs der mutierten Androgenrezeptoren AR V715M und AR V730M exprimierten. Abbildung 14 A (links) zeigt die Expression der mutierten AR-Proteine in den resultierenden PC3 AR V715M- und PC3 V730M-Zellklonen im Vergleich zur Rezeptormenge in LNCaP- und PC3 AR_{wt}-Zellen. In den verwendeten Klonen wurden die verschiedenen AR-Proteine in ähnlicher Menge gebildet. Um festzustellen, ob die Expression der AR-Mutanten in diesen Zellklonen auch zu einer vergleichbaren Transaktivierung führt, wurde die DHT-abhängige Induktion eines androgen-abhängigen Maus Mamma Tumor Virus (MMTV)-Luciferasereporterkonstrukts (pHCwt-luc) in Transfektionsexperimenten untersucht. Dieser Reporter wurde verwendet, da der *long terminal repeat* (LTR) des MMTV vier AR-Bindestellen (*androgen response element*, ARE) enthält und ein gut untersuchtes Modell für die positive Genregulation durch den AR darstellt. Wie im rechten Teil von Abbildung 14 A tabellarisch dargestellt, unterschieden sich die AR-Mutanten nur geringfügig in der Fähigkeit, dieses androgen-abhängige Reporterkonstrukt in Gegenwart von DHT zu transaktivieren. Sie waren deshalb geeignet, um die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung vergleichend zu untersuchen.

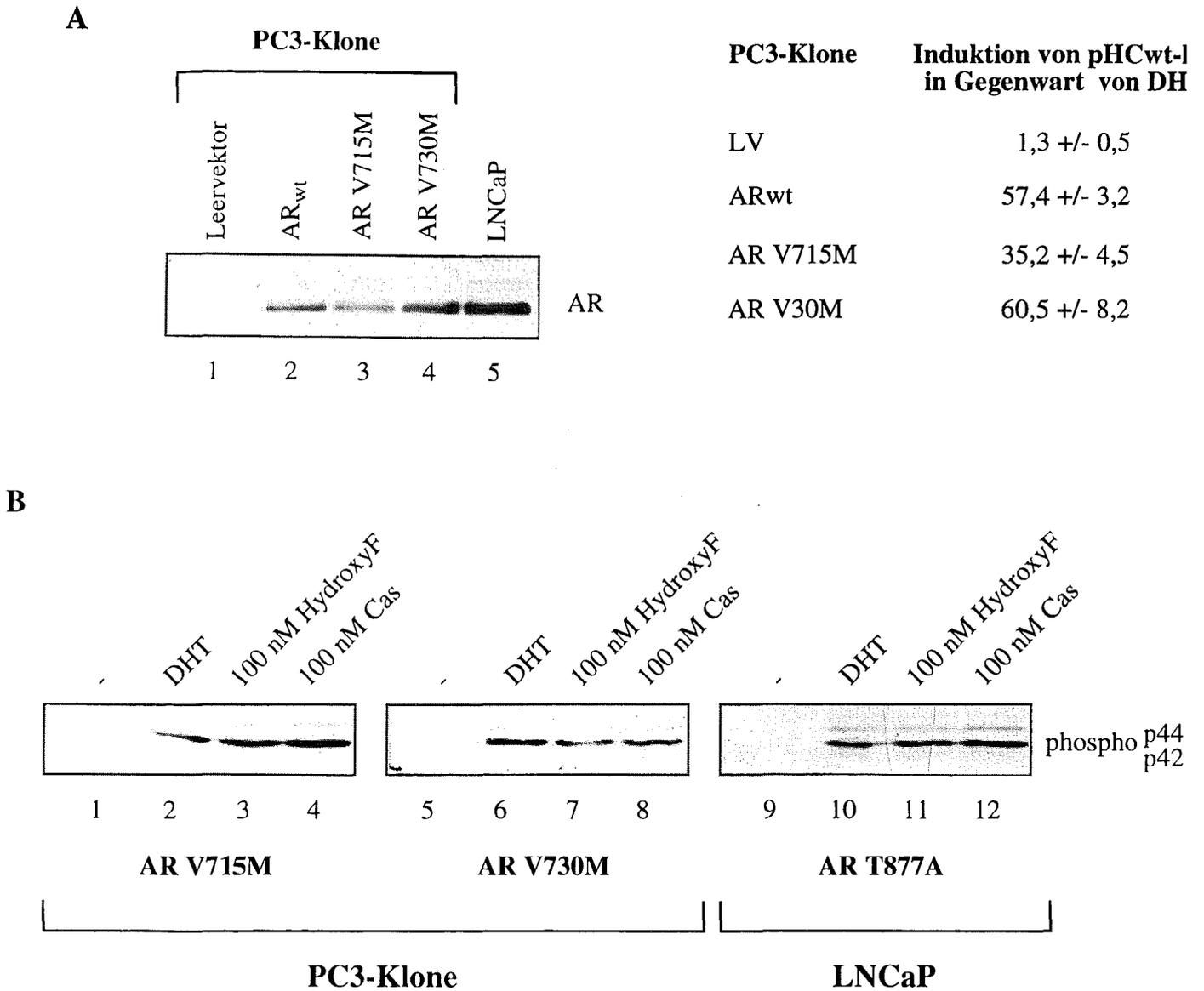


Abb. 14: Unveränderte Aktivierung von ERK 1 und 2 durch Antiandrogene in Zellen mit mutierten Androgenrezeptoren. (A) links: PC3 AR-Zellklone und LNCaP-Zellen exprimieren vergleichbare Mengen an AR-Protein. *Western blot*-Analyse mit Extrakten von PC3 LV-, PC3 AR_{wt}-, PC3 V715M-, PC3 V730M- und LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in RPMI mit 10 % FCS kultiviert, auf Eis geerntet, lysiert und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transferieren auf eine Membran wurde das AR-Protein mit dem spezifischen hAR-Antikörper sp061 (Verdünnung 1:1000) nachgewiesen. rechts: Die mutierten Androgenrezeptoren zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp-AR in der Transaktivierung eines klassischen androgen-abhängigen Reportergens. Je 5 x 10⁵ PC3 LV, PC3 AR_{wt}-, PC3 AR V715M- und PC3 AR V730M-Zellen pro Ansatz wurden 24 h vor der Transfektion in DMEM mit 3 % CCS ausplattiert. Mittels der Calciumphosphat-Coprazipitationsmethode wurden die Zellen mit jeweils 10 µg des Indikatorplasmids pHCwt-

luc transient transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 nM DHT oder als Kontrolle mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, auf Eis lysiert und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferaseaktivität von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Die Induktionswerte ergeben sich aus der Division der DHT-induzierten durch die uninduzierte Luciferaseaktivität. Die Zahlen der Tabelle entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen der DHT-Induktion aus zwei Transfektionsexperimenten. (B) Hydroxyflutamid und Casodex induzieren ERK-Phosphorylierung in PC3-Zellen mit mutierten Androgenrezeptoren. *Western blot*-Experiment mit Extrakten aus PC3 AR V715M-, PC3 AR V730M- und LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion wurde ein Mediumwechsel zu RPMI mit 0,5 % CCS durchgeführt. Die Behandlung der Zellen erfolgte für jeweils 30 min mit 100 nM DHT (Spuren 2, 6 und 10), 100 nM Hydroxyflutamid (HydroxyF, Spuren 3,7 und 11), 100 nM Casodex (Cas, Spuren 4, 8 und 12) oder Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spuren 1, 5 und 9). Die Zellen wurden auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in 10 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Membranen wurden die phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44) mit einem spezifischen Antikörper (Verdünnung 1:1000) nachgewiesen.

LNCaP-Zellen und diese PC3 AR V715M- und PC3 AR V730M-Klone wurden für 30 min mit 10 nM DHT bzw. mit 100 nM und 10 μ M Hydroxyflutamid oder Casodex behandelt (Abb. 14 B) und die Phosphorylierung von ERK 1/2 untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den AR-Mutanten bezüglich der ERK-Aktivierung. Bei allen untersuchten Mutanten wird die Phosphorylierung auch durch die eingesetzten Antiandrogene in vergleichbarer Stärke induziert. Antiandrogene wirken also auf die untersuchten Mutanten ebenso wie auf den Wildtyp-AR als positive Regulatoren der ERK-Aktivierung.

Die für diesen Effekt ausreichenden Antiandrogenkonzentrationen von 100 nM liegen auch hier deutlich unter derjenigen, welche für Transrepression durch den Wildtyp-AR und für Transaktivierung und Transrepression durch die AR-Mutanten AR V715M und AR V730M notwendig war (vergleiche Abschnitt 3.1). Die MAPKinasen-Phosphorylierung stellt also eine spezifische Antwort des Androgenrezeptors dar, welche auch durch Antiandrogene aktiviert wird.

Die untersuchten AR-Mutationen innerhalb der Hormonbindedomäne haben also keinen Einfluß auf die ERK-Phosphorylierung in Gegenwart von DHT und Antiandrogenen. Es wurden deshalb Mutationen in anderen Regionen des AR untersucht, um festzustellen, ob diese in Bezug auf die ERK-Phosphorylierung einen Unterschied zum Wildtyp-Rezeptor zeigen. Dies ließe möglicherweise einen Schluß auf die Eigenschaften des Rezeptors zu, die für eine ERK-Aktivierung notwendig sind.

3.2.6.2 Mutationen in der aminoterminalen Domäne des Androgenrezeptors: Verlängerung der Glutaminhomopolymerfolge

Im N-Terminus des AR gibt es variable Regionen, welche aus Homopolymerabfolgen von Glycinen und Glutaminen bestehen, den sogenannten Glycin- bzw. Glutaminstretches. Glutamine werden durch die Nucleotidsequenz CAG codiert. Die Länge des Glutaminstretches variiert bei der Gesamtpopulation zwischen 10 und 36 CAG-Folgen, bei einer X-chromosomal vererbten Krankheit, der spinalen und bulbären Muskelatrophie (SBMA, auch als Kennedy-Syndrom bezeichnet) ist diese Glutaminabfolge über die normale Variabilität hinaus auf 40 bis 62 CAGs verlängert (La Spada et al., 1991). Vermutlich führt eine solche Rezeptormutation nicht zu einem Funktionsverlust des AR (Neuschmid-Kaspar et al., 1996), dennoch ist diese Krankheit in manchen Fällen von einer leichten Form der Androgenresistenz begleitet (Warner et al., 1992, Brooks et al., 1997). Um den Effekt dieser amplifizierten Glutaminregion auf die MAPkinase-Aktivierung zu untersuchen, wurde eine Rezeptormutante, welche eine Abfolge von 77 Glutaminen enthielt (AR Q77) stabil in PC3-Zellen transfiziert. In Abbildung 15 ist die *Western blot*-Analyse der DHT-induzierten MAPK-Phosphorylierung eines PC3-Zellklons dargestellt, welcher AR Q77 in ähnlicher Quantität exprimiert, wie die in dieser Arbeit bisher beschriebenen AR-Mutanten.

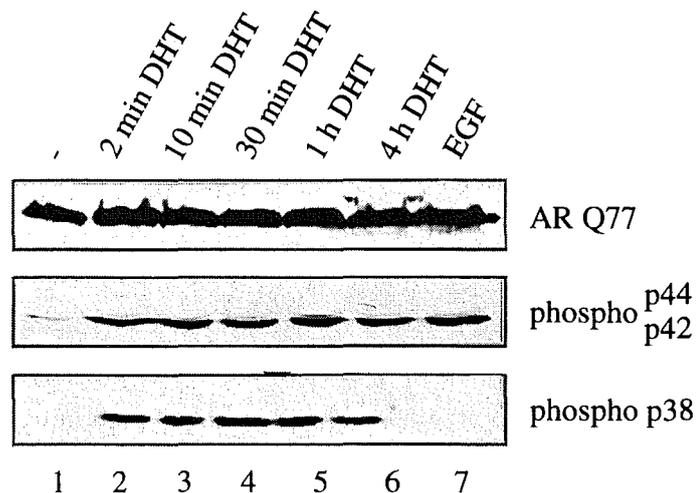


Abb. 15: DHT-Effekt auf MAPKinasen in Zellen, welche einen mutierten AR mit verlängerter Glutaminabfolge im Aminoterminus exprimieren. *Western blot*-Analyse mit Extrakten von PC3 AR Q77-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage in DMEM mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) kultiviert und zu 80 % konfluent ausplattiert. 16 h vor der Hormoninduktion erfolgte ein Wechsel zu Medium mit 0,5 % CCS. Die Behandlung der Zellen erfolgte für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT (Spuren 2-6) oder für 10 min mit 5 ng/ml EGF (Spur 7) oder Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1) behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transferieren auf eine Membran wurden die verschiedenen Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Detektion des AR Q77 (oberstes Kästchen) erfolgte mittels eines Antikörpers gegen den menschlichen AR (F 39.4.1, 1:1000), die Immunnachweise der phosphorylierten Formen von ERK 1/2 (phospho p42/p44, mittleres Kästchen) und p38 (phospho p38, unterstes Kästchen) wurden mit den entsprechenden phospho-spezifischen Antikörpern (Verdünnung jeweils 1:1000) durchgeführt.

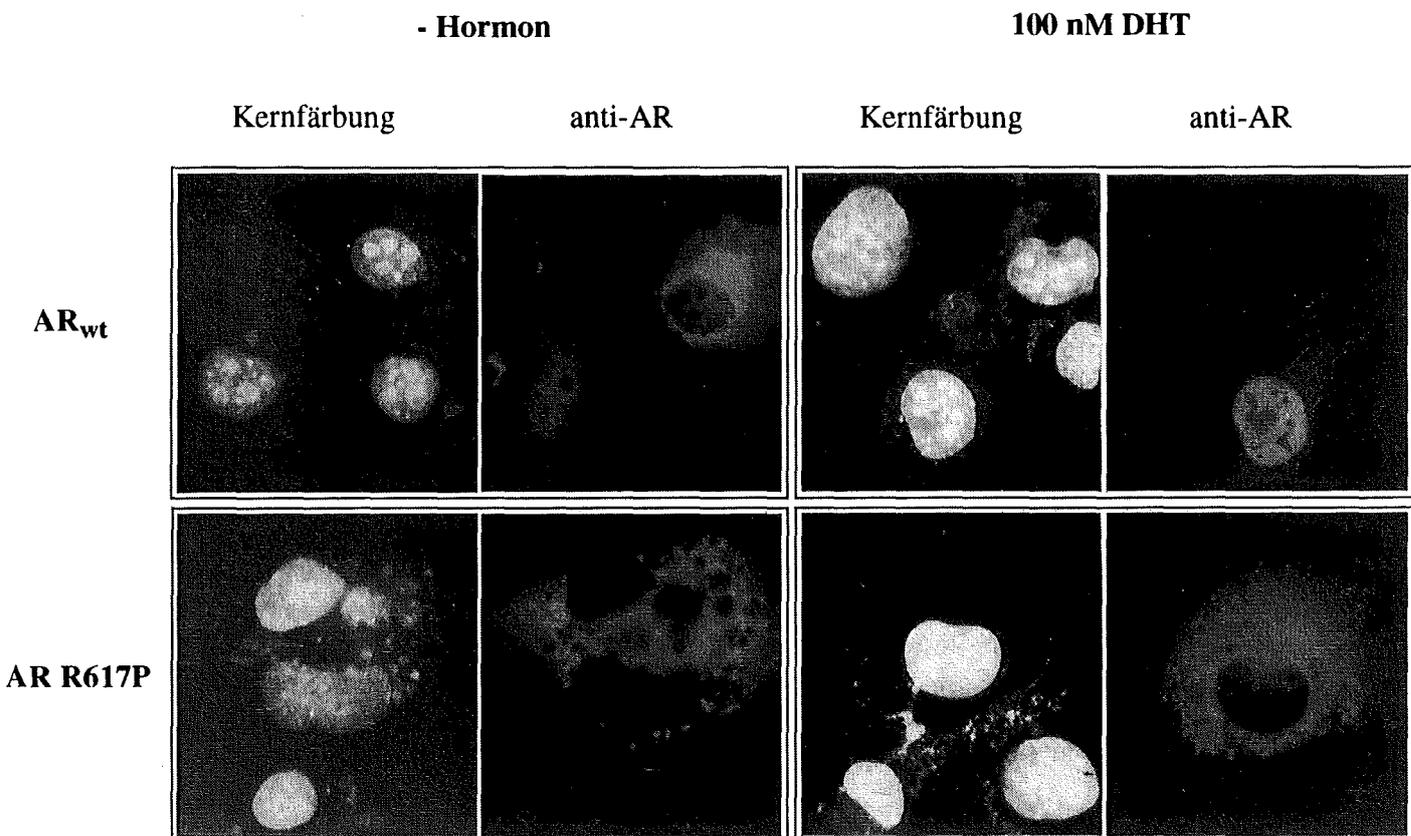
Die Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 als DHT-Antwort ist auch bei diesem Zellklon zu beobachten. Die Hormonaktivierung dieses Rezeptors führte, im Unterschied zu den bisher untersuchten AR-Varianten, außerdem zu einer Phosphorylierung der MAPKinasen-Isoform p38. Die p38-Phosphorylierung ist nach 2 min zu erkennen und hält über 4 Stunden in gleicher Intensität an. Ob diese zusätzliche Funktion des mutierten Rezeptors in Zusammenhang mit der durch die Verlängerung der Glutaminabfolge hervorgerufenen Krankheit steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Das Ergebnis zeigt jedoch, daß die Aminosäurehomopolymere in der aminoterminalen regulatorischen Domäne des AR bei der Bestimmung der Subtypspezifität der MAPKinasen-Antwort vermutlich eine wesentliche Rolle spielen. Zusätzlich weist die MAPK-Phosphorylierung bei dieser AR-Mutante eine etwas veränderte Kinetik im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor auf: nach 4-stündiger Behandlung der Zellen war die ERK-Phosphorylierung noch sichtbar erhöht, während sie beim AR_w zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu beobachten war. Dieses Charakteristikum war auch bei einer weiteren natürlich vorkommenden Mutante zu beobachten, die im folgenden beschrieben wird.

3.2.6.3 Ein kerntranslokationsdefekter Androgenrezeptor ist noch in der Lage, die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 zu induzieren

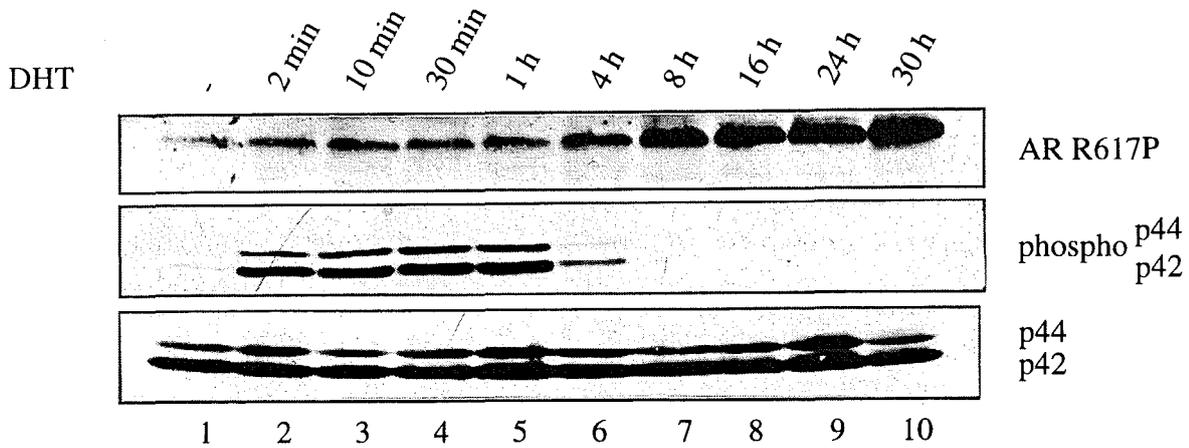
Die schnelle Kinetik der Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 durch DHT und die Tatsache, daß Antiandrogene hierbei als Agonisten wirken können, legt die Vermutung einer nicht-genomischen Wirkung des Androgenrezeptors nahe. Um dies zu verifizieren, wurde die Verfügbarkeit eines mutierten Androgenrezeptors genutzt, welcher bei einem Patienten mit komplettem Androgeninsensitivitätssyndrom (auch als Androgenresistenz bezeichnet) und demzufolge weiblichem Phänotyp identifiziert wurde. Dieser Rezeptor enthält eine Punktmutation in der Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*, Jenster et al., 1993), welche zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin an Position 617 führt (AR R617P). Dieser Rezeptor zeigt keinen Unterschied in der Steroidbindungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp-AR (Zoppi et al., 1992). Da die Mutation in der für den Kerntransport notwendigen NLS liegt, wurde untersucht, ob diese AR-Mutante wie der Wildtyp-Rezeptor nach Behandlung mit DHT in den Kern transloziert. Dazu wurden Zellen der AR-negativen Affennierenzelllinie Cos-7 transient mit einem Konstrukt transfiziert, welches die cDNA des Wildtyp-AR bzw. der AR R617P-Mutante enthielt. Die Bestimmung der Lokalisierung des Rezeptors erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-AR Antikörpers (F39.4.1) und eines Rhodamin-gekoppelten sekundären Antikörpers. Es zeigte sich, daß DHT-Behandlung der Zellen für 1 h eine vollständige Translokation des Wildtyp-Rezeptors in den Zellkern bewirkte (Abbildung 16 A, oberer Teil, vergleiche zweites und viertes Bild von links). Dagegen verblieb die NLS-Rezeptormutante AR R617P auch nach Hormonbehandlung ausschließlich im Cytoplasma (Abb. 16 A, unterer Teil, vergleiche zweites und viertes Bild von links). Jeweils das erste und dritte Bild von links in der Abbildung zeigt die entsprechenden Zellen, bei welchen mittels Färbung mit dem kernspezifischen Farbstoff bis-Benzimid (Hoechst Nr. 33250, Sigma) die Nuclei sichtbar gemacht wurden. Bei einer transienten Transfektion wird das transfizierte Konstrukt, hier die cDNA des Wildtyp- und des mutierten AR, nur von einigen Zellen aufgenommen und exprimiert. Der Vergleich zwischen Kernfärbung und Immunfluoreszenzsignal dokumentiert also die Spezifität des AR-Immunnachweises, denn nur ein Teil der Zellen (welche demzufolge ein Androgenrezeptorprotein bildeten) wiesen ein Fluoreszenzsignal auf. Bei den AR_{w_t}-exprimierenden Zellen befand sich ein Teil des AR-Proteins bereits vor der Hormonbehandlung im Zellkern, die NLS-Mutante dagegen war vollständig vom Kerntransport ausgeschlossen (vergleiche oben und unten, 2. Bild von links).

Der kernlokalisationsdefekte Rezeptor AR R617P wurde stabil in PC3-Zellen transfiziert. Dabei ergaben sich einige Schwierigkeiten, da das mutierte AR-Protein offensichtlich durch seine ausschließlich cytoplasmatische Expression weniger stabil ist als das Wildtyp-AR-Protein. Durch die stabile Transfektion wurde nur ein Zellklon erhalten, in welchem der mutierte Rezeptor, wie durch Immunnachweis mit einem spezifischen AR-Antikörper (sp061) gezeigt, in nachweisbarer Menge exprimiert wurde. Es stellte sich heraus, daß es nicht möglich war, diesen stabilen Zellklon für längere Zeit in hormonfreiem Medium zu kultivieren, da dies zu einem schnellen Verlust der AR-Expression führte. Dagegen bewirkte Behandlung der Zellen mit DHT eine Stabilisierung des AR R617P-Proteins (siehe Abb. 16 B, oberstes Kästchen, AR R617P). Diese auch beim Wildtyp-AR zu beobachtende Stabilisierung beruht vermutlich direkt auf der Bindung des Hormons durch eine resultierende Interaktion zwischen N-Terminus und Hormonbindedomäne des AR (Kemppainen et al., 1992, Zhou et al., 1995). Um den Verlust des Rezeptors zu verhindern, wurden die PC3 AR R617P-Zellen deshalb in Medium mit 10 % foetalem Kälberserum (FCS), das geringe Mengen an Hormon mit androgener Aktivität enthält, kultiviert. Erst 16 h vor exogener Hormongabe im Experiment wurde die Serumkonzentration auf 0,5 % CCS reduziert.

A



B



C

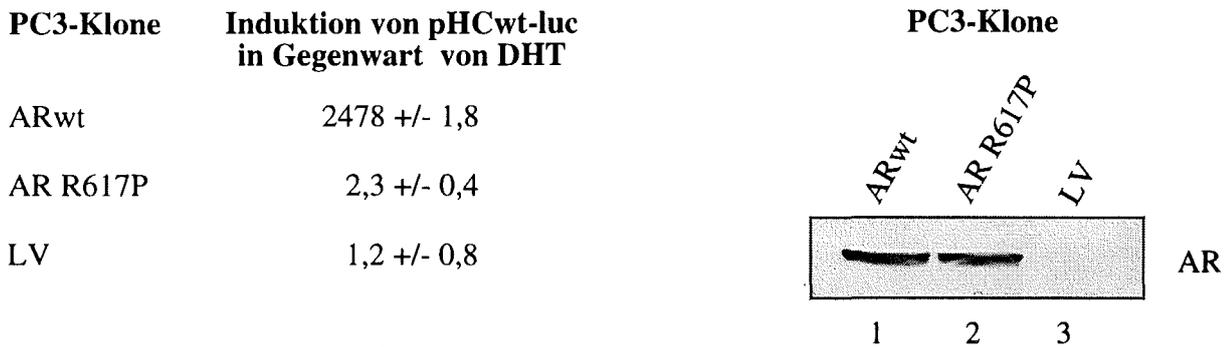


Abb. 16: Die DHT-induzierte Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 erfordert keinen Kerntransport des Androgenrezeptors. (A) Bestimmung des Kerntransports von Wildtyp-AR und AR R617P mittels indirekter Immunfluoreszenz. Cos7-Zellen wurden durch Elektroporation mit je 15 µg der Expressionsvektoren von Wildtyp-AR (obere Bildreihe) und AR R617P (untere Bildreihe) pro Ansatz transfiziert und in DMEM mit 10 % FCS auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium gegen DMEM mit 3 % CCS ausgewechselt und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Die Induktion erfolgte für eine Stunde mit 100 nM DHT oder mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine. Die Zellen wurden mit 3 % Paraformaldehyd in wässriger Lösung für 15 min fixiert, anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen für 15 min mit 50 mM NH₄Cl behandelt. Unspezifische Bindungen wurden durch Vorinkubation mit 0,2% Gelatine in PBS für 20 min abgesättigt. Die Inkubation mit dem AR-spezifischen Antikörper F 39.4.1 (BioGenex) erfolgte für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:10 mit 0,2 % Gelatine in PBS bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurde der Rhodamin-markierte Ziege anti-Maus-Sekundärantikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1: 50 mit 0,2 % Gelatine in PBS für 1 h appliziert.

Anschließend wurde für 5 min 1:1000 in PBS verdünntes bis-Benzimid (Hoechst Nr. 33250, Sigma) für die Kernfärbung zugegeben. Die Deckgläschen wurden mit Einschlußmedium (*mounting medium*, Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträger montiert, mit Nagellack abgedichtet und im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet. (B) DHT-Induktion der ERK-Phosphorylierung in Zellen mit kernlokalisationsdefektem AR. *Western Blot*-Analyse mit Extrakten von PC3 AR R617P-Zellen. Die Zellen wurden bis zur 80 %igen Konfluenz in RPMI mit 10 % FCS kultiviert, 16 Stunden vor Zugabe der Induktoren wurden sie in Medium mit 0,5 % CCS gehungert. Anschließend erfolgte die Behandlung für die angegebenen Zeiten mit 100 nM DHT (Spuren 2-10) oder für 30 min mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1). Die Zellen wurden auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in 10 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Membranen wurden das mutierte AR-Protein (AR R617P, oberes Kästchen), die phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44, mittleres Kästchen) und das gesamte exprimierte ERK 1/2 (p42/p44, unteres Kästchen) mit spezifischen Antikörpern (Verdünnung jeweils 1:1000) nachgewiesen. (C) Der mutierte AR R617P kann ein klassisches androgenabhängiges Reporter gen nicht transaktivieren. Je 5×10^5 PC3 AR_{wt}-, PC3 AR R617P- und PC3 LV-Zellen pro Ansatz wurden 24 h vor der Transfektion in DMEM mit 3 % CCS ausplattiert. Mittels der Calciumphosphat-Coprazipitationsmethode wurden die Zellen mit jeweils 10 µg des Indikatorplasmids pHCwt-luc transient transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 nM DHT oder als Kontrolle mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, auf Eis lysiert und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luciferaseaktivität von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Die Induktionswerte ergaben sich durch Division der Luziferaseaktivitäten der Extrakte der jeweiligen DHT-behandelten durch die der Extrakte der unbehandelten Zellen. Die Zahlen der Tabelle (**links**) entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen der DHT-Induktion aus zwei Transfektionsexperimenten. **rechts**: *Western blot*-Analyse der AR-Menge in Extrakten der mit pHCwt-luc transfizierten PC3-Zellklone. Die Zellen jeweils einer Schale der transfizierten PC3 AR_{wt}- (Spur 1), PC3 AR R617P- (Spur 2) und AR LV-Klone (Spur 3) wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 100 nM DHT auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein für einen Immunnachweis des AR-Proteins in einem *Western blot*-Experiment mit dem AR-spezifischen Antikörper F 39.4.1 eingesetzt.

Wie in Abbildung 16 B dargestellt, ist dieser ausschließlich cytoplasmatisch lokalisierte Rezeptor immer noch in der Lage, die schnelle Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 zu vermitteln. Auch in diesem AR R617P exprimierenden Zellklon war wie bei den PC AR Q77-Zellen nach 4 Stunden noch eine Phosphorylierung der ERKs nachweisbar.

Der mutierte Androgenrezeptor war, wie durch seine cytoplasmatische Lokalisierung zu erwarten, auch nicht in der Lage, ein klassisches androgen-abhängiges Reporterkonstrukt (pHCwt-luc) zu transaktivieren, während AR_{wt} eine starke DHT-induzierte Expression dieses Reporters zeigte (Abb. 16 C, links). Der parallel durchgeführte AR-Immunnachweis zeigt, daß AR_{wt}- und AR R617P-Protein gebildet wurden. Die fehlende DHT-Induktion in PC3 AR R617P-Zellen war also nicht auf einen Verlust der Expression des Rezeptors zurückzuführen (Abb. 16 C, rechts).

Die Tatsache, daß diese kernlokalisations- und transaktivierungsdefekte AR-Mutante dennoch die ERK-Phosphorylierung als schnellen Effekt vermittelt, zeigt eindeutig, daß es sich hierbei um eine neue, cytoplasmatische Funktion des AR handelt. Wie und auf welcher Ebene der AR im Cytoplasma der Zelle in den normalerweise durch Wachstumsfaktoren induzierten Signaltransduktionsweg eingreift, wurde im folgenden genauer analysiert.

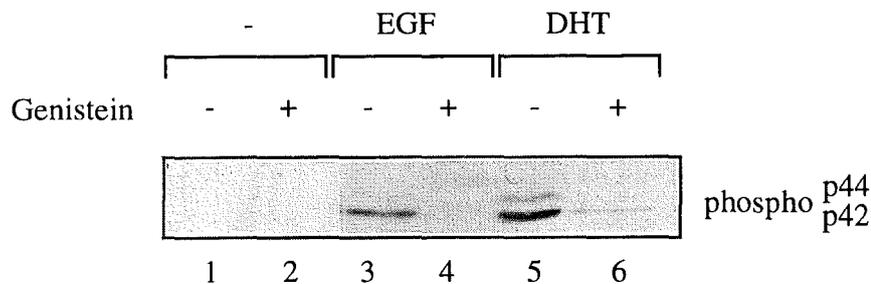
3.2.7 Verschiedene Kinaseinhibitoren und dominant-negative Kinasen verhindern die dihydrotestosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 zur Aktivierung der nachfolgenden Signalkette und zur verstärkten Expression des *immediate early* Gens c-fos führt (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Um die Abfolge der Ereignisse vom AR zur Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 näher zu charakterisieren, wurde die Beteiligung verschiedener Proteinkinasen an der DHT-Antwort in PC3 AR_{wt}-Zellen untersucht.

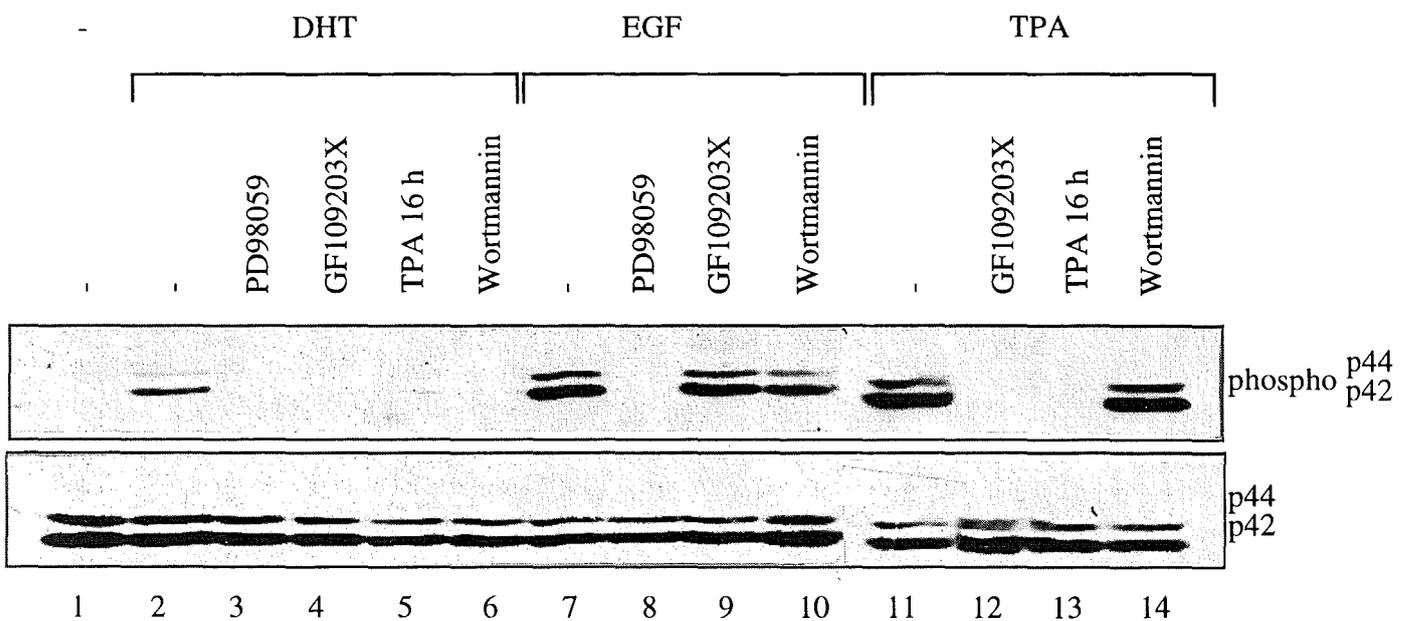
Einer der ersten Schritte bei der wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung ist die Tyrosinphosphorylierung der MAPkinase. Darum wurde geklärt, ob Tyrosinkinase an der Induktion des AR-vermittelten Effekts beteiligt sind. Hierzu wurden die Zellen 15 min vor der Hormoninduktion mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein (Geissler et al., 1990) vorbehandelt und der Effekt auf die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung in einer *Western blot*-Analyse untersucht. Es zeigte sich, daß Genistein in der Lage war, den DHT-Effekt, ebenso wie die EGF-Antwort, die als Positivkontrolle betrachtet wurde, vollständig zu blockieren (Abbildung 17 A). Dies zeigt eine Parallele zwischen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion und der DHT-Wirkung in AR-positiven PC3-Zellen.

Aus diesem Grund wurde die Beteiligung anderer Proteinkinasen, welche in Signaltransduktionswege durch Wachstumsfaktoren involviert sind, untersucht. Dazu wurde die Verfügbarkeit folgender spezifischer Inhibitoren genutzt: a) PD98059 (Dudley et al., 1995), ein Inhibitor der MAPK/ERK-Kinase (MEK). b) Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3 K) (Ward et al., 1996) und c) GF109203X (Toullect et al., 1991), ein Inhibitor der Proteinkinase C (PKC). Außerdem wurden die Zellen 16 h mit TPA vorbehandelt. Eine solche verlängerte TPA-Behandlung bewirkt eine Desensibilisierung der Zellen gegenüber Induktoren der PKC-Aktivität durch verringerte Expression verschiedener Isoformen dieses Enzyms (Fabbro et al., 1986). Normalerweise wirksame Stimuli können dann nicht mehr zur Aktivierung phorbolster-sensitiver PKC-Subtypen führen. Das Ergebnis der Untersuchungen mit den Proteinkinaseinhibitoren ist in Abbildung 17 B dargestellt.

A



B



C

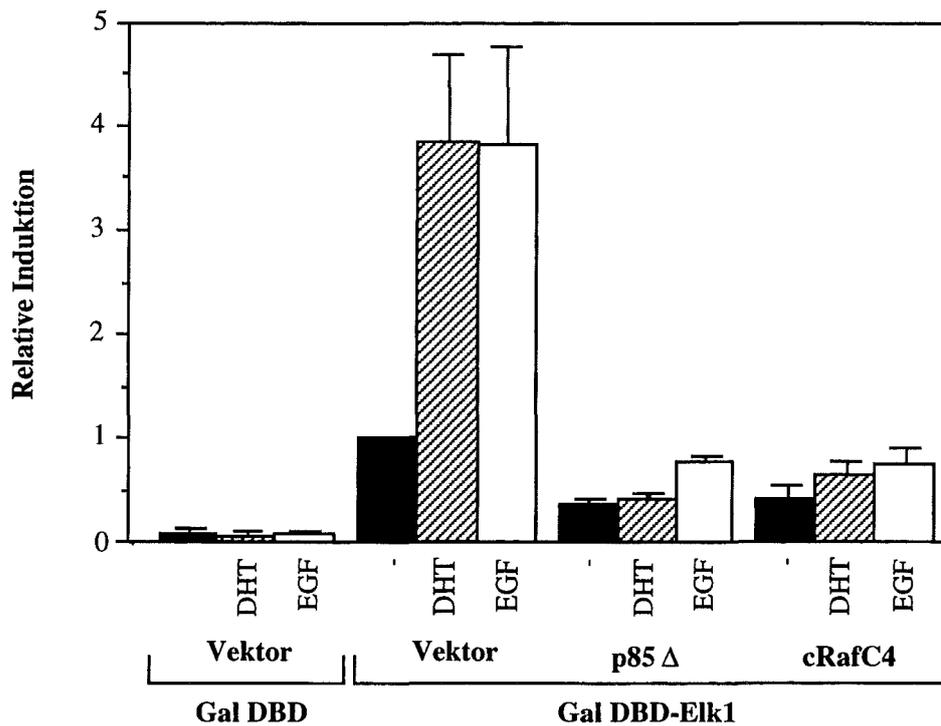


Abb. 17: MEK, PKC und PI3 Kinase sind an der DHT-induzierten Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 beteiligt. (A) Beteiligung von Phosphotyrosinkinasen. Phospho ERK 1/2-Immunoblot mit Extrakten von PC3 AR_{wt}-Zellen. Die Zellen wurden für 15 min mit Genistein (50 μ M, Spuren 2, 4 und 6) oder Vehikel (hier 0,1 % DMSO, Spuren 1, 3 und 5) alleine vorinkubiert und anschließend für 10 min mit 5 ng/ml EGF (Spuren 3 und 4) oder für 30 min mit 100 nM DHT (Spuren 5 und 6) oder Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spuren 1 und 2) behandelt. (B) Inhibitoren von MEK, PKC und PI3 Kinase hemmen die DHT-induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2. Western blot-Analyse mit Extrakten von PC3 AR_{wt}-Zellen. Die Zellen wurden für 2 Tage in RPMI mit 3 % Aktivkohle-behandeltem FCS (CCS) und anschließend für 16 h in RPMI mit 0,5 % CCS kultiviert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 nM DHT (Spuren 2-6) oder mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (Spur 1) in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Inhibitoren. Als Kontrolle erfolgte eine Induktion der ERK-Phosphorylierung durch 10 minütige Behandlung mit 5 ng/ml EGF (Spuren 7-10) oder 80 ng/ml TPA (Spuren 11-14) ebenfalls in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren. Die Inhibitoren wurden 15 min vor Zusatz der Induktoren zugegeben, Abwesenheit der Inhibitoren bedeutet dabei Zugabe von Vehikel (für die Inhibitoren: 0,1 % DMSO) (Spuren 1, 2, 7 und 11). Bei den verwendeten Inhibitoren handelte es sich um 50 μ M PD98059 (Spuren 3 und 8), 500 nM GF109203X (Spuren 4, 9 und 12) und 100 nM Wortmannin (Spuren 6, 10 und 14). Im Falle einer verlängerten Vorbehandlung mit Phorbolster (TPA 16 h, Spuren 5 und 13) wurden die Zellen 16 h vor der Zugabe der Induktoren mit 80 ng/ml TPA inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis geerntet, aufgebrochen und Extrakte mit den gleichen Mengen Protein in 10 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Membranen wurden die phosphorylierten Formen von ERK 1 und ERK 2 (phospho p42/44, A, oberes Kästchen in B) und das gesamte ERK 1/2 (p42/p44, unteres Kästchen in B) mit spezifischen Antikörpern (Verdünnung jeweils 1:1000) nachgewiesen. (C) Dominant-negative Mutanten der PI3 Kinase und von Raf-1 hemmen die DHT-induzierte Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von Elk-1. PC3 AR_{wt}-Zellen wurden vor der Transfektion für mindestens 2 Tage in Medium mit 3 % CCS

kultiviert. Eineinhalb Millionen Zellen wurden transient mit 1 μg des leeren Expressionsvektors RSV-H20 (Vektor) oder dominant-negativem p85 (p85 Δ) oder dominant-negativem cRafC4, 1 μg der Gal4-DBD alleine (pSG424) oder als Fusionskonstrukt mit Elk-1 (pSG Gal4-Elk-1), und 8 μg eines Gal4-Luziferase Konstrukts (pG5.E4 Δ 38 lux3) cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 h in Medium mit 3 % CCS, anschließend für 16 h in Medium mit 0,5 % CCS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit Vehikel (0,1 % Ethanol) alleine (gepunktete Balken), mit 100 nM DHT (gestreifte Balken) oder mit 5 ng/ml EGF (weiße Balken) behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet, auf Eis lysiert und ein Luziferasetest mit gleichen Mengen Protein durchgeführt. Als Maß der Luciferaseaktivität wurden die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) von Extrakten mit gleicher Proteinmenge in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) gemessen. Das Säulendiagramm stellt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der induzierten Luciferaseaktivitäten aus fünf unabhängigen Experimenten dar. Diese Aktivität wurde im Falle der Basalaktivität des Reporters in Anwesenheit des Fusionsproteins aus Gal4-DBD und Elk-1 und RSV-H20 (Vektor) dem Wert 1 gleichgesetzt. Alle anderen Werte wurden relativ dazu ausgedrückt.

Um sicher zu sein, daß die Kinaseinhibitoren in den Zellen wirksam waren, wurde ihr Effekt auf die EGF- (Abb. 14 B, Spuren 7-10) und TPA- (Spuren 11-14) induzierte ERK-Phosphorylierung getestet. Die Vorbehandlung mit den verschiedenen Inhibitoren führte dabei zu den erwarteten Effekten. So verhinderte der MEK-Inhibitor PD98059 (Spur 8), nicht jedoch der PKC-Inhibitor (Spur 9), die durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF induzierte ERK-Phosphorylierung. Wortmannin zeigte eine hemmende Wirkung (Spur 10), dies entspricht Beobachtungen, daß in manchen Zellen die Stimulation von EGF zur Aktivierung der PI3 Kinase führt (Bjorge et al., 1990, Jackson et al., 1992, Akimoto et al., 1996). Die TPA-induzierte ERK-Aktivierung konnte zwar durch den PKC-Inhibitor GF109203X (Spur 12) und Behandlung der Zellen mit TPA über Nacht (Spur 13) gehemmt werden, nicht jedoch durch den PI3 Kinaseinhibitor Wortmannin (Spur 14).

Die DHT induzierte ERK-Phosphorylierung in PC3 AR_{wt}-Zellen entsprach bezüglich der Beteiligung der untersuchten Kinasen weder vollständig der durch TPA- noch der durch EGF-vermittelten ERK-Aktivierung: Es zeigte sich, daß der MAPK/ERK Kinaseinhibitor PD98059 die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung verhinderte. Hemmung des DHT-vermittelten Effekts durch 15 minütige Vorbehandlung mit dem Inhibitor GF109203X zeigte die Beteiligung einer PKC-Isoform an der Signaltransduktion durch den AR. Dies wurde durch den vollständigen Verlust der ERK-Phosphorylierung bei verlängerter Vorbehandlung mit TPA über Nacht bestätigt. Fünfzehn minütige Vorbehandlung der Zellen mit Wortmannin führte ebenfalls zu einer starken Hemmung des DHT-Effekts auf ERK 1 und ERK 2.

Um die Beteiligung der PI3 Kinase und die Spezifität der Hemmung durch Wortmannin zu verifizieren, wurde die Verfügbarkeit einer dominant-negativen Mutante der regulatorischen 85 kDa-Untereinheit der PI3 Kinase (p85 Δ , Brennan et al., 1997) genutzt. Dieser Mutante fehlt die Bindestelle für die katalytische 110 kDa-Untereinheit der PI3 Kinase (p110). Sie verhindert darum die Regulation des aktiven Enzymkomplexes und seine Rekrutierung an die Plasmamembran (Dhand et al., 1994). Entsprechend zu den in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen

Ergebnisse

Cotransfektionsexperimenten mit dem Gal4-Elk1-Konstrukt, wurde die Wirkung dieses dominant-negativen p85 Δ auf die DHT- und EGF-induzierte Aktivierung des Gal4-Luziferase Reporters in PC3 AR_{wt}-Zellen untersucht. Das in Abbildung 17 C dargestellte Ergebnis zeigt, daß die DHT-induzierte Reporteraktivität vollständig durch Coexpression von p85 Δ gehemmt wird und bestätigt so die Beteiligung der PI3 Kinase an der DHT-induzierten Aktivierung von ERK 1 und 2. Auch die EGF-induzierte Aktivierung des Reporterkonstrukts wird durch p85 Δ -Coexpression vermindert. Die PI3-Kinase ist also sowohl in die DHT- als auch in die EGF-Signaltransduktion in PC3 AR_{wt}-Zellen involviert. Dies wurde schon aufgrund der in Abbildung 14 A zu erkennenden Hemmung der ERK-Aktivierung durch Wortmannin vermutet.

Da Raf-1 als MAPkinase Kinase Kinase oberhalb von MEK innerhalb der Kaskade von regulatorischen Ereignissen ist, welche zu einer verstärkten Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 führen, wurde zusätzlich der Effekt einer dominant-negativen Mutante von Raf-1 (RSV-cRafC4, Bruder et al., 1992) auf die Elk-1 Aktivität untersucht. Coexpression von cRafC4 führte wie die Coexpression von p85 Δ zu einer Reduktion der basalen Reporteraktivität auf etwa die Hälfte. Die DHT- und EGF-induzierte Aktivierung wurde vollständig gehemmt. Insgesamt weisen diese Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten also darauf hin, daß DHT den MEK/MAPK-Signaltransduktionsweg über einen PI3 Kinase und Raf-1 einschließenden Weg aktiviert.

Zusammengefaßt zeigen die in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse, daß es eine spezifische cytoplasmatische Funktion des Androgenrezeptors gibt, welche die schnelle Aktivierung der MAPkinasen ERK 1 und ERK 2 einschließt. Wie durch die Verwendung von Proteinkinaseinhibitoren und dominant-negativen Kinasen gezeigt wurde, stellt die Signaltransduktion des Androgensignals einen eigenen Weg dar, der sich von dem durch EGF oder Phorbolster induzierten Signalweg unterscheidet. Diese Wirkung unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch die verwendeten Antiandrogene von den bisher bekannten klassischen Funktionen des Androgenrezeptors als Transkriptionsfaktor. Die AR-induzierte Aktivierung des MAPkinase-Signaltransduktionswegs muß deshalb in Zukunft berücksichtigt werden, wenn nach wirkungsvolleren Androgenantagonisten für die Therapie von Prostatakrebs gesucht wird.

4 Diskussion

Eine Funktion des Androgenrezeptors ist seine klassische Wirkung im Zellkern als Transkriptionsfaktor mit der Fähigkeit zur positiven und negativen Genregulation. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit beschrieben, daß der AR außerdem nicht-genomische Wirkungen als Vermittler der cytoplasmatischen Signaltransduktion besitzt. Insbesondere wurde der Effekt von Antiandrogenen, welche bei der vollständigen Androgenablationstherapie bei Prostatakrebs angewandt werden, auf die verschiedenen Funktionen des AR analysiert. Außerdem wurde die Auswirkung von Mutationen des AR im Hinblick auf die verschiedenen AR-Wirkungen untersucht.

4.1 Klassische Funktionen des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor ist wie alle Steroidhormonrezeptoren zur klassischen Kernrezeptorfunktion in der Lage, d.h. er kann als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen positiv oder negativ regulieren. Die transkriptionelle Aktivität von Kernrezeptoren kann durch Antihormone inhibiert werden. Diese Beobachtung bildet die Basis für die therapeutische Anwendung solcher Hormonantagonisten. Es gibt jedoch Fälle, in denen die Antihormone selbst als positive Regulatoren wirken, das bedeutet, sie sind ebenfalls in der Lage Transaktivierung und Transrepression durch den Steroidhormonrezeptor zu vermitteln. Im Falle des AR kann dies beobachtet werden, wenn bestimmte Mutationen in der Hormonbindedomäne des Rezeptors auftreten (zur Übersicht siehe Barrack, 1996 und Tabelle in Abschnitt 1.3.1). Da solche Mutationen bei Patienten mit Prostatakrebs gefunden wurden, wird postuliert, daß ihr Vorhandensein die Insensitivität des AR gegenüber einer Antiandrogenbehandlung bestimmt.

In Abschnitt 3.1 dieser Arbeit wurde die Transaktivierung und Transrepression durch zwei dieser mutierten Rezeptoren analysiert. Diese AR-Mutanten enthalten identische Aminosäureaustausche von Valin zu Methionin an nahe zusammenliegenden Positionen in der Hormonbindedomäne des Rezeptors (AR V715M und AR V730M). Die Sensitivität dieser Mutanten gegenüber den Antihormonen Hydroxyflutamid und Casodex, welche bei der Prostatakrebstherapie häufig eingesetzt werden, wurden in transienten Transfektionsexperimenten bestimmt.

4.1.1 Transaktivierung in Gegenwart von Antiandrogenern

Die antiandrogen-abhängige Transaktivierung durch die mutierten Androgenrezeptoren wurde in Cotransfektionsanalysen in der rezeptornegativen Affennierenzelllinie CV-1 untersucht (siehe Abschnitt 3.1). Als Beispiel für ein durch Androgene positiv reguliertes Gen wurde ein Reporterkonstrukt mit einer dimerisierten AR-Bindestelle vor einer TATA-Box und einem Chloramphenicol-Acetyltransferasegen (ARE_2 TATA CAT) verwendet. Ein solches Konstrukt erlaubt es, gezielt die durch DNA-Bindung des AR vermittelte Transaktivierung zu betrachten. AR V715M und AR V730M zeigten eine gegenüber dem Wildtyp-AR signifikant erhöhte Fähigkeit, dieses Reporter-gen in Gegenwart von hohen Antiandrogenkonzentrationen (100 μ M) zu transaktivieren.

Das Verhalten eines AR mit einer Mutation in der Hormonbindedomäne (HBD) kann durch eine genauere Analyse der HBD möglicherweise besser bewertet werden. Anhand röntgenkristallographischer Spektren wurden die dreidimensionalen Strukturen der Hormonbindedomänen des menschlichen Retinsäurerezeptors γ (RAR γ) und des menschlichen 9-cis Retinsäurerezeptors α (RXR α) (Bourguet et al., 1995) beschrieben. Basierend auf diesen Kristallstrukturen wurden die Hormonbindedomänen verschiedener Mitglieder der Steroidhormonrezeptorfamilie in 12 α -Helices (H1-H12) und zwei β -Faltblattstrukturen eingeteilt (Wurtz et al., 1996). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Helix 12, welche nach Ligandenbindung in das Zentrum der dreidimensionalen Struktur umklappt.

In Untersuchungen am Estrogenrezeptor (ER) wurde gezeigt, daß H3, H6, H8, H11, H12 und die zwei β -Faltblattstrukturen gemeinsam die dreidimensionale Struktur der ligandenbindenden Kavität bilden (Brzozowski et al., 1997). Die unterschiedlichen Positionierungen der Helix 12, welche in Gegenwart von Estrogenen und Antiestrogenen beobachtet wurden, waren dabei für die beobachteten funktionellen Unterschiede bei der Transaktivierung verantwortlich (Brzozowski et al., 1997, Nichols et al., 1998). Dies bedeutet, nur der agonisten-beladene ER konnte die geeignete Konformation für die Transaktivierung und für die Rekrutierung von Cofaktoren einnehmen. Es wurde jedoch gezeigt, daß Mutationen in der HBD dazu führten, daß auch Antagonisten die für die Transaktivierung notwendige Positionierung der Helix 12 induzieren konnten (Nichols et al., 1998).

Ordnet man die Aminosäuren der AR-Hormonbindedomäne aufgrund der bekannten Kristallstrukturen der Retinsäurerezeptoren den einzelnen Helices zu, so befinden sich die meisten der bisher bei Prostatakrebspatienten identifizierten Mutationen in H3, H11, und H12 (Fuhrmann et al., 1997). Die mutierten Aminosäuren an Positionen 715 und 730 liegen vermutlich zwischen H3 und H4 bzw. in H4 der HBD des Rezeptors. Diese Aminosäuren befinden sich damit in der Nähe der für den ER beschriebenen Helices, welche an der Bildung der hormonbindenden Oberfläche beteiligt sind.

Möglicherweise verändern also die Aminosäureaustausche die sterische Konformation der Ligandenbindungsdomäne der mutierten AR so, daß sowohl Androgene als auch Antiandrogene die Fähigkeit zur Transaktivierung vermitteln können. Falls zukünftige funktionelle Analysen der noch nicht charakterisierten AR-Mutanten eine ähnliche erweiterte Steroidspezifität zeigen wie AR V715M und AR V730M, würde dies darauf hinweisen, daß die diese Mutationen tragenden Helices ebenfalls einen wichtigen Teil der ligandenbindenden Oberfläche des AR bilden. Eine solche Hypothese ließe sich mit Röntgenkristallstrukturanalysen an Wildtyp- und mutierten Androgenrezeptoren nachweisen. Solche Untersuchungen wurden bisher am AR jedoch nicht durchgeführt.

Aktivierung eines mutierten AR durch Antiandrogene wurde erstmals in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP beschrieben. Diese Zellen sind metastasierende Prostatakrebszellen, welche einen funktionellen AR mit einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin an Position 877 (T877A) der HBD exprimieren. (In Analogie zur Struktur der Retinsäurerezeptoren entspräche dies der Helix 11.) In diesen Zellen reichte bereits eine niedrige Konzentration (10 nM) an Hydroxyflutamid aus, um die positive genregulatorische Funktion des mutierten AR T877A zu induzieren (Veldscholte et al., 1990, Veldscholte et al., 1992, Berrevoets et al., 1993). Mehrere Erklärungsmöglichkeiten wurden für dieses veränderte Verhalten des mutierten Rezeptors vorgeschlagen. So weist diese AR-Mutante zum Beispiel eine stärkere Affinität zu Hydroxyflutamid (Veldscholte et al., 1990), eine erhöhte Stabilisierung (Kemppainen & Wilson, 1996) und eine veränderte Konformation in Gegenwart des Antiandrogens (Kuil & Mulder, 1994) auf.

Bei der Untersuchung der mutierten Rezeptoren AR V715M und AR V730M auf diese Eigenschaften wurde deutlich, daß sie nicht diesen Charakteristika der AR-Mutation aus LNCaP-Zellen entsprechen. Sie zeigten zum Beispiel keinen Unterschied gegenüber AR_{wt} in einem partiellen tryptischen Verdau, bei welchem eine unterschiedliche Konformation der Rezeptoren durch eine Veränderung des Fragmentmusters sichtbar gemacht werden kann. Für den AR wurde beschrieben, daß in einem solchen Test, aufgrund einer Konformationsänderung nach Bindung eines Agonisten, ein 30 kDa-Fragment, welches die Hormonbindedomäne enthält, vor dem proteolytischen Abbau geschützt wird (Kallio et al., 1994). Bei der Mutante AR T877A aus LNCaP-Zellen konnte dieses für Agonisten charakteristische Fragment auch in Gegenwart von Hydroxyflutamid beobachtet werden. Beim hydroxyflutamid-beladenen Wildtyp-Rezeptor trat ein solches Fragment dagegen nicht auf (Kuil & Mulder, 1994).

Bei der Analyse der hier verwendeten Androgenrezeptormutante AR V715M zeigte sich jedoch, daß bei niedrigen Konzentrationen an Hydroxyflutamid und Casodex das Fragmentmuster ebenso wie das des Wildtyp-AR dem des unbeladenen AR entsprach. Dagegen wurde bei hohen Konzentrationen der beiden Antiandrogene sowohl bei AR_{wt} als auch bei der Mutante das für Agonisten charakteristische 30 kDa-Fragment geschützt, der Wildtyp-AR und AR V715M

nahmen also die "aktive" Konformation ein (Peterziel et al., 1995). Diese Konformationsänderung kann demzufolge nicht die beschriebene im Vergleich zu AR_{wt} erhöhte Transaktivierung durch die AR-Mutante bei 100 µM Konzentrationen an Antiandrogen erklären. Dies schließt jedoch nicht aus, daß sich der Wildtyp-AR und die zwei Mutanten AR V715M und AR V730M in ihrer Konformation unterscheiden. Möglicherweise könnte durch Verwendung geeigneter anderer Proteasen oder, wie oben beschrieben, in Röntgenstrukturanalysen eine veränderte Konformation gezeigt werden.

In Untersuchungen der Bindungsaffinität von Hydroxyflutamid und Casodex zu AR V715M bzw. AR V730M und AR_{wt}, zeigte sich ebenfalls keinen Unterschied zwischen diesen Rezeptoren. Bei einer Konzentration von 100 µM verdrängten die Antiandrogene das hochaffine synthetische Androgen R1881 (Methyltrienolon) vollständig von der Bindung an den Wildtyp- bzw. die mutierten Rezeptoren (Peterziel et al., 1995). Die verstärkte Transaktivierung durch die mutierten Rezeptoren in Gegenwart von Hydroxyflutamid und Casodex hat also möglicherweise andere Gründe als die direkte Liganden-Rezeptor-Interaktion.

Betrachtet man die in dieser Arbeit dargestellten Transaktivierungsexperimente genauer, so wird deutlich, daß Hydroxyflutamid und (in geringerem Maße) Casodex in einer Konzentration von 100 µM auch das Transaktivierungspotential des Wildtyp-AR erhöhen, allerdings deutlich schwächer als das der AR-Mutanten. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigten, daß hohe Konzentrationen (≥ 10 µM) Hydroxyflutamid in transienten Transfektionsexperimenten in CV-1-Zellen zur Transaktivierung eines androgenresponsiven Reporters durch den Wildtyp-AR führen (Wong et al., 1995, Kempainen & Wilson, 1996).

Auch für Estrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) ist eine Erhöhung der Transaktivierung in Abhängigkeit von Zelltyp und Promotorkontext durch Antihormone beschrieben worden (Berry et al., 1990, Katzenellenbogen et al., 1996, Meyer et al., 1990, Sartorius et al., 1993). In diesen Fällen gibt es Hinweise darauf, daß Wechselwirkungen mit Cofaktoren determinieren, ob die Antihormone agonistische oder antagonistische Wirkung haben (Jackson et al., 1997, Smith et al., 1997). Antihormone können demnach vermutlich nicht nur durch kompetitive Bindung an den jeweiligen Rezeptor dessen Transaktivierungsfunktion hemmen. Statt dessen können antihormon-beladene Rezeptoren möglicherweise auch direkt Corepressoren zum Transkriptionskomplex rekrutieren und so die Transaktivierung durch den Rezeptor verhindern. Diese Hypothese basiert auf Untersuchungen in denen gezeigt wurde, daß die Überexpression eines Corepressors zur Hemmung der Antiestrogen-stimulierten Genexpression führte, während kein Effekt auf die Estradiol-induzierte Transaktivierung zu beobachten war. Eine Überexpression von Coaktivatoren führte dagegen zu einer verstärkten Transaktivierung in Gegenwart von Antihormonen (Smith et al., 1997)

Wie bei ER und PR könnten Interaktionen von Androgen/Antiandrogen-beladenen Androgenrezeptoren mit verschiedenen Coaktivatoren und Corepressoren die genregulatorischen Eigenschaften des AR beeinflussen und zu einer Verstärkung der Transaktivierung führen. Mutationen des AR wären dann möglicherweise in der Lage, durch Änderung der Konformation des Rezeptors das komplexe Wechselspiel zwischen Rezeptor und Cofaktor zusätzlich zu modifizieren. So ist es denkbar, daß das im Vergleich zum Wildtyp-AR erhöhte Transaktivierungspotential der Mutanten AR V715M und AR V730M in Gegenwart der Antiandrogene auf eine veränderte Interaktion mit Cofaktoren zurückzuführen ist. Bisher wurden drei Coaktivatoren des Androgenrezeptors beschrieben. Diese sind das in der Prostatakarzinomzelllinie DU145 identifizierte AR-assoziierte Protein ARA₇₀ (Yeh & Chang, 1996), das CREB (*cAMP response element binding protein*)-Bindeprotein CBP (Aarnisalo et al., 1998) und der *transcription mediator/intermediary factor* TIF2 (Voegel et al., 1996). Untersuchungen mit ARA₇₀ haben gezeigt, daß es in Anwesenheit eines Agonisten das Transaktivierungspotential des Wildtyp-AR um das gleiche Maß erhöht wie das der mutierten Rezeptoren. ARA₇₀ bindet jedoch nicht an den Antiandrogen-beladenen Wildtyp-AR (Yeh & Chang, 1996) und es gibt keinen Hinweis, daß es an der Verstärkung der Transaktivierung von AR V715M und AR V730M in Gegenwart von Hydroxyflutamid und Casodex beteiligt ist (J. Schneikert, persönliche Mitteilung). Auch Überexpression von TIF2 (Voegel et al., 1996) und CBP (Aarnisalo et al., 1998) bewirken in transienten Transfektionen eine Verstärkung der Transaktivierung durch den AR; über die Wirkung von Antiandrogenern auf diese Effekte und die Aktivität der hier untersuchten Punktmutationen ist jedoch nichts bekannt.

Die Punktmutationen in AR V715M und AR V730M führen also zu einer Erhöhung der Transaktivierung durch den Rezeptor in Gegenwart von Hydroxyflutamid und Casodex. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die Beobachtung, daß die Antiandrogene auch am Wildtyp-Rezeptor als Agonisten wirken können. Diese agonistische Wirkung zeigte sich noch deutlicher bei der Untersuchung der Transrepression in Gegenwart von Hydroxyflutamid und Casodex am Beispiel des Collagenase I-Promotors.

4.1.2 Transrepression in Gegenwart von Antiandrogenern

In Abschnitt 3.1.2 dieser Arbeit wurde beschrieben, daß Wildtyp- und mutierte Androgenrezeptoren keinen Unterschied bezüglich der Effizienz der Transrepression am Collagenase I-Promotor in Anwesenheit der Antiandrogene Casodex und Hydroxyflutamid aufweisen. Dies wurde in transienten Transfektionsexperimenten analysiert, bei denen die mutierten Rezeptoren und AR_w mit einem Collagenase I-Promotorkonstrukt in CV-1-Zellen

cotransfiziert wurden. Der Wildtyp-AR (AR_{wt}) und die Mutanten AR V715M und AR V730M waren in der Lage, in Gegenwart von Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ dieser Antiandrogene die induzierte Transkription des Reportergens annähernd ebenso stark zu reprimieren, wie in Gegenwart von 100 nM DHT. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die Antihormone im Vergleich zu den Beobachtungen bei der Transaktivierung (Kapitel 3.1.1) sogar in niedrigeren Konzentrationen als Agonisten wirkten. Die Gründe für diese agonistische Wirkung der Antiandrogene sind nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, daß, wie für die Transaktivierung beschrieben, auch bei der Transrepression durch den AR die Rekrutierung bestimmter Cofaktoren eine Rolle spielen könnte.

Bisher ist jedoch noch wenig über die Transrepression von Genen durch den Androgenrezeptor bekannt. Dies macht es schwierig, ein Modell für die agonistische Wirkung der Antihormone bei dieser Rezeptorfunktion aufzustellen. Die Expression von Collagenase I wird durch die Aktivierung von AP-1 und dessen Interaktion mit einem Mitglied der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren positiv reguliert (Gutman & Wasylyk, 1990). In einer Untersuchung zur negativen Regulation durch den AR wurde beschrieben, daß die Transrepression der Collagenase I-Expression durch den Androgenrezeptor vermutlich nicht auf einer Protein-Protein-Interaktion des AR mit AP-1, sondern mit dem Ets-Protein beruht (Schneikert et al., 1996). Eine solche Wechselwirkung zwischen AR und dem Ets-Faktor ERM (*ets related molecule*) wurde auch in *in vitro*-Interaktionstests nachgewiesen. Die Hemmung der Collagenase I-Expression durch Androgen erfordert den Kerntransport aber weder DNA-Bindung noch Dimerisierung des Androgenrezeptors (Schneikert et al., 1996). Möglicherweise werden bei der Transrepression also völlig andere Anforderungen an die Ligandenbindung gestellt als bei der Transaktivierung, so daß auch Antihormone in der Lage sein könnten, diese Funktion zu vermitteln. Dies würde möglicherweise auch die niedrigere wirksame Antiandrogenkonzentration bei der Transrepression erklären.

Die untersuchten Rezeptormutanten verhalten sich also bezüglich der negativen Genregulation, wie hier am Beispiel der Collagenase I gezeigt, in Gegenwart von Antiandrogenen nicht anders als der Wildtyp-AR. Hinsichtlich einer möglichen Bedeutung von AR-Mutationen am Fortschreiten von Prostata Tumoren, schließt dies den Verlust der Fähigkeit zur Transrepression als Erklärung für die Insensitivität gegenüber Antiandrogenbehandlung aus. Andererseits wird jedoch deutlich, daß weder Wildtyp- noch mutierte Rezeptoren durch Antiandrogene vollständig in ihrer Funktion blockiert werden. Dies gilt in besonderem Maße für die im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur nicht-genomischen Wirkung des Androgenrezeptors.

4.2 Androgene und Signaltransduktion

Durch die Analyse von schnellen Androgeneffekten in Prostatazellen wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß der AR als Mediator nicht-genomischer Signale wirken kann. Es gibt inzwischen einige Beispiele in der Literatur dafür, daß Steroidhormone schnelle Effekte auslösen, die nicht mit der Funktion ihrer Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren im Zellkern erklärt werden können (Lieberherr & Grosse, 1994, Migliaccio et al., 1996, Caelles et al., 1997, Endoh et al., 1997, Watters et al., 1997, Migliaccio et al., 1998). Statt dessen sind vermutlich zelluläre Signaltransduktionskaskaden involviert.

4.2.1 Erhöhung der cytosolischen Calciumionen-Konzentration durch Androgen

Veränderungen in der cytosolischen Calciumkonzentration wurden nach Behandlung von Zellen mit verschiedenen Steroidhormonen, darunter Androgenen (Gorczyńska & Handelsman, 1991, Steinsapir et al., 1991, Lieberherr & Grosse, 1994), Estrogenen (Morley et al., 1992, Farhat et al., 1996) und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Morelli et al., 1993, Jones & Sharpe, 1994), beschrieben. In keinem dieser Fälle ist bekannt, ob die entsprechenden Steroidhormonrezeptoren für diese Effekte verantwortlich sind, oder ob sie auf einer Membranwirkung der Hormone selbst beruhen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen unter Verwendung von AR-negativen und AR-positiven Prostatakarzinomzellen, daß der Androgenrezeptor eine Veränderung der Calciumkonzentration durch DHT vermittelt. Dies wurde durch das Auftreten von Calciumoszillationen in Rezeptorexprimierenden Zellen verdeutlicht. Solche Oszillationen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) stellen eine allgemeine Form der zeitlichen Organisation von zellulären Signalen dar. Die Zelle besitzt zu diesem Zweck verschiedene calciumbindende und -transportierende Proteine und Calciumkanäle, welche den extrazellulären Calciumeinstrom oder die Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum regulieren. Plasmamembranoszillationen findet man häufig bei erregbaren Zellen, hier werden sie durch das Öffnen und Schließen von spannungsabhängigen Calciumkanälen gesteuert. Über den Mechanismus durch den cytosolische Calciumoszillationen entstehen, ist noch wenig bekannt (zur Übersicht siehe Berridge, 1993, Tsunoda, 1993, Thomas et al., 1996).

Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ sind weitverbreitete intrazelluläre Signale, welche unter anderem Kohlenhydratmetabolismus, Zellzyklus und Genexpression regulieren. Calciumionen wirken dabei als Botenstoffe, sogenannte *second messenger*, welche nach Stimulation von Zellen durch extrazelluläre Hormone oder Wachstumsfaktoren freigesetzt werden (zur Übersicht siehe Kenedy, 1989, Schulman, 1993, Berridge, 1993). Es wird angenommen, daß Calcium die Konformation von Proteinen verändern kann und daß durch Calciumoszillationen frequenzmoduliert Proteinphosphorylierungen reguliert werden.

4.2.2 Androgenrezeptor-vermittelte Phosphorylierung von ERK 1 und 2

Phosphorylierung von Proteinen ist einer der wesentlichen Schritte bei der Signalübertragung durch mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPKinasen, MAPK), deren Aktivierung in vielen Zelltypen durch Ca^{2+} als *second messenger* ausgelöst wird (Chao et al., 1992, Rosen et al., 1994). Da der Androgenrezeptor die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ vermitteln kann, gab es also stichhaltige Gründe, anzunehmen, daß der AR auch an der Phosphorylierung verschiedener Proteine der zellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt sein könnte.

Tatsächlich zeigte die Analyse des Androgeneffekts auf die Aktivierung der MAPKinasen ERK 1 und ERK 2, daß der AR in diesen Signaltransduktionsweg eingreift. Die Wirkung von DHT auf die MAPKinasen ERK 1 und ERK 2 erwies sich als schnell und transient. Der Nachweis einer Aktivierung war schon nach zweiminütiger Androgenbehandlung möglich, der Effekt hielt eine Stunde an, mit einem Maximum bei 30 min. Dies wurde anhand von zwei verschiedenen Analysen gezeigt: 1) durch den Nachweis einer Phosphorylierung von ERK 1/2 durch Androgen im *Western blot* und 2) durch die Fähigkeit des AR die *in vitro* Phosphorylierung des Myelin-basischen Proteins (MBP) zu vermitteln. Solche schnellen Wirkungen von Androgenen wurden bisher nicht mit dem AR in Verbindung gebracht. Hier konnte jedoch gezeigt werden, daß die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 strikt abhängig von der Anwesenheit des Androgenrezeptors ist, da in AR-negativen Zellen dieser DHT-Effekt nicht zu beobachten war. Die Androgenantwort ist dabei subtypspezifisch, andere MAPK wie JNK 1 und JNK 2 oder p38 werden nicht aktiviert. Diese Spezifität der MAPKinasen-Aktivierung entspricht den Beobachtungen, daß die Aktivierungsprofile der verschiedenen Isoformen durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli nicht identisch sind. Zum Beispiel haben Induktoren, welche eine starke ERK-Phosphorylierung bewirken, häufig nur einen geringen oder keinen Effekt auf die JNKinasen und umgekehrt (zur Übersicht siehe Cano & Mahadevan, 1995, Karin, 1995).

In Abschnitt 3.2.4 dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die schnelle und transiente Aktivierung der MAPkinase-Aktivität durch DHT mit einer ebenso schnellen und transienten Expression des *immediate early* Gens *c-fos* (siehe Abschnitt 3.2.4, Abb. 11) korreliert ist. Dies weist darauf hin, daß es sich bei diesem AR-Effekt um einen regulatorischen Prozeß handelt, welcher für die Erhöhung der Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren funktionell relevant sein könnte. Eine Erhöhung der ERK- und *c-fos*-Aktivität resultiert häufig in einer verstärkten Zellproliferation. Die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung könnte also *in vivo* zur Stimulation der Zellproliferation führen, da MAPkinase- und AR-Signalwege mit diesen Prozessen in Zusammenhang gebracht worden sind (Cunha et al., 1987, Fanger et al., 1997). Die Aktivierung von *c-fos* wird durch gemeinsame Bindung von Elk-1, einem direkten Substrat von ERK 1 und ERK 2, als *ternary complex factor* (TCF) und dem *serum response factor* SRF (Gille et al., 1995a, Treisman, 1996) an den Promotor des *c-fos*-Gens vermittelt. In den in Kapitel 3.2.4 dargestellten Cotransfektionsexperimenten mit einem Gal4-Elk-1 Fusionskonstrukt und einem Gal4-Luciferasereporter konnte der AR folgerichtig auch die transkriptionelle Aktivität von Elk-1 erhöhen. Diese Beobachtung ermöglichte die Anwendung solcher Transfektionsanalysen als zusätzlichen Weg zur Untersuchung der an dieser AR-Signaltransduktion beteiligten Schritte.

4.2.2.1 Aktivierungsschritte der cytoplasmatischen Androgenrezeptorwirkung

Es gibt in letzter Zeit verschiedene Untersuchungen zur ERK-Phosphorylierung durch Steroidhormonrezeptoren (Migliaccio et al., 1996, Migliaccio et al., 1998), wobei jedoch in diesen Fällen bisher keine nachfolgenden Effekte dieser Aktivierung beschrieben wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der schnelle AR-vermittelte Androgeneffekt auf die ERK-Phosphorylierung mit einer transkriptionellen Aktivierung des endogenen *c-fos*-Gens korreliert ist. Es ist wahrscheinlich, daß diese Aktivierung aufgrund ihrer Schnelligkeit nicht auf die klassische Transaktivierungsfunktion des AR zurückgeführt werden kann. Verschiedene Untersuchungen an Progesteronrezeptor (PR) und Mineralocorticoidrezeptor (MR) haben gezeigt, daß die Bindung des entsprechenden Hormons an den Rezeptor und dessen Kerntransport etwa 5-10 Minuten erfordert (Fefes-Toth et al., 1998). Die Transkription hormonabhängiger Gene beginnt etwa nach 15 min und erreicht ihr Maximum nach 1 Stunde. Zu diesem Zeitpunkt ist die Aktivierung von *c-fos* durch die MAPkinase bereits abgeschlossen. Möglicherweise stellt diese Androgenwirkung also einen cytoplasmatischen AR-Effekt dar.

Den Beweis einer solchen cytoplasmatischen Funktion des AR bei der schnellen MAPKinas-Aktivierung erbrachten die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente, bei denen ein kerntranslokationsdefekter mutierter AR (AR R617P) immer noch in der Lage war, ERK 1 und ERK 2 zu aktivieren (siehe Abschnitt 3.2.6.3, Abb. 16). Dieser Effekt dauerte etwas länger an, nach 4 h war noch eine deutliche Erhöhung der ERK-Phosphorylierung zu erkennen, während dies bei AR_{wt} nicht der Fall war. Eine Erklärung für diese verlängerte Androgenantwort könnte sein, daß der NLS (*nuclear localization signal*)-mutierte AR R617P im Cytoplasma der Zellen verbleibt, während zur Kerntranslokation fähige AR-Proteine bereits wenige Minuten nach Hormonbehandlung zum größten Teil im Zellkern zu finden sind. Dadurch kann dieser mutierte AR möglicherweise effektiver mit cytoplasmatischen Partnern interagieren. Einen weiteren Hinweis für die Richtigkeit dieser Vermutung liefert die in Abschnitt 3.2.6.2 beschriebene Beobachtung, daß ein AR mit verlängerter Glutaminabfolge (AR Q77) ebenfalls eine verlängerte ERK-Phosphorylierung zeigt. Dies ist in Übereinstimmung mit dem reduzierten oder fehlenden Kerntransport, welcher für AR Q77 und einen weiteren mutierten AR mit einer erhöhten Anzahl an Glutaminen beobachtet wurde (M. Becker, persönliche Mitteilung, Brooks et al., 1997).

Die Androgenrezeptormutante AR Q77 vermittelte zusätzlich die Phosphorylierung der MAPKinas p38 durch Androgen. AR-Mutationen mit einer Verlängerung der Glutaminabfolge im Aminoterminus des AR sind korreliert mit dem Auftreten von spinaler und bulbärer Muskelatrophie (SBMA), einer sich spät manifestierenden neurodegenerativen Erkrankung (Kennedy et al., 1968). Ob die in dieser Arbeit beobachtete Verlängerung der ERK-Phosphorylierung und der zusätzliche Effekt auf die Phosphorylierung der MAPKinas p38 mit dieser Erkrankung in Zusammenhang stehen, wurde hier nicht analysiert.

Zusätzlich zum Auftreten der verlängerten Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 unterschied sich der kerntranslokationsdefekte AR R617P in einer weiteren Beobachtung vom Wildtyp-AR. Während bei Wildtyp-AR exprimierenden Zellen eine zweite Erhöhung der ERK-Phosphorylierung nach 6-8 h eintrat, zeigten AR R617P-Zellen nur die schnelle ERK-Phosphorylierung (2 min bis 4 h). Dies verdeutlicht, daß der AR die Aktivierung der MAPKinas auf zwei Arten vermittelt, er besitzt einen frühen und einen späten Effekt. Möglicherweise ist die zweite Induktion der ERK-Phosphorylierung auf eine Aktivierung von A-Raf zurückzuführen, eines Mitglieds der Raf-Protoonkogenfamilie. A-Raf besitzt ebenso wie Raf-1 die Fähigkeit, die Raf-MEK-MAPK Proteinkinasekaskade zu aktivieren (Rapp, 1991, Avruch et al., 1994). Es gibt Untersuchungen, daß der Glucocorticoidrezeptor A-Raf durch Bindung an zwei *glucocorticoid response elements* (GRE) im humanen A-Raf-Promotor positiv reguliert (Lee et al., 1996). In vielen Fällen kann der AR an die gleichen *response elements* binden, wie der GR (Cato et al., 1987, Ham et al., 1988, Beato 1989). Aus Untersuchungen an der Maus ist außerdem bekannt, daß A-Raf vor allem im Urogenitaltrakt, also Niere, Hoden und Epididymis (Nebenhoden), exprimiert wird (Wadewitz et al., 1993, Winer et al., 1993).

Nach Kastration der Mäuse ist keine A-Raf-Expression in den Nebenhoden mehr nachweisbar, durch exogene Androgengabe wird die Expression wiederhergestellt (Winer & Wolgemuth, 1995). Dies weist auf eine physiologische Regulation des A-Raf-Gens durch den AR hin, welche dann möglicherweise wiederum die späte ERK-Phosphorylierung auslösen könnte. In dieser Arbeit wurden jedoch nur die schnellen nicht-genomischen Effekte des Androgenrezeptors näher analysiert.

4.2.2.2 Effekt von Kinaseinhibitoren und dominant-negativen Kinasen auf die dihydrotestosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung

Um die einzelnen Schritte zu identifizieren, über die der AR die ERK-Aktivierung induziert wurden verschiedene spezifische Kinaseinhibitoren verwendet. Dabei zeigte sich, daß der MEK Inhibitor PD98059 die DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung hemmt. Die MAPkinase Kinase (MEK) ist die Kinase in der Signaltransduktionskaskade, welche ERK 1 und ERK 2 an jeweils einem Threonin und einem Tyrosin phosphoryliert. Diese dualspezifische Phosphorylierungsfunktion von MEK selbst wird durch die MAPkinase Kinase Kinase (MEK-Kinase) Raf-1 aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung von MEK an zwei Serinpositionen durch cRaf-1 (zur Übersicht siehe Cano & Mahadevan, 1995, Su & Karin, 1996). Die Raf-1-Aktivierung kommt durch Interaktion mit Ras-GTP und anschließende Translokation zur Plasmamembran oder durch Oligomerisation im Cytoplasma zustande (Marshall, 1996). In dieser Arbeit wurde darum untersucht, welchen Effekt eine fehlende Raf-1-Aktivierung auf die DHT-induzierte Aktivierung der MEK/MAPK-Kaskade hat. In den in Abschnitt 3.2.7 dargestellten Transfektionsexperimenten inhibierte ein dominant negatives Raf-1 Konstrukt die DHT-induzierte Elk-1-Aktivierung, was auf die Beteiligung von cRaf-1 an diesem Signaltransduktionsweg durch Androgene hinweist. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die androgenabhängige Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 über Raf-1 oder einen Angriffspunkt oberhalb Raf-1 in der MEK/MAPK-Signaltransduktionskaskade verläuft.

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, welcher mit der Aktivierung von MAPKinasen verknüpft sein kann ist der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3 Kinase)-Weg. Den ersten Hinweis auf eine Beteiligung dieses Signaltransduktionswegs an der DHT-induzierten ERK-Aktivierung lieferte die beobachtete Hemmung der ERK-Phosphorylierung durch den PI3 Kinaseinhibitor Wortmannin im *Western blot*. Bestätigt wurde diese Mitwirkung der PI3 Kinase an der cytoplasmatischen Signaltransduktion des AR zusätzlich durch den inhibitorischen Effekt einer dominant-negativen Mutante der regulatorischen PI3 Kinase-Untereinheit (p85 Δ) bei der Aktivierung von Elk-1 in Transfektionsexperimenten (Abschnitt 3.2.7). Die PI3 Kinase besitzt sowohl Protein- als auch Lipidkinaseaktivität und spielt bei der Übermittlung mitogener Signale, Inhibition von Apoptosis, intrazellulärem Vesikeltransport und -sekretion und bei Zellmotilität eine wichtige Rolle (zur Übersicht siehe Carpenter & Cantley, 1996). Vor kurzem wurde beschrieben, daß die PI3 Kinase über einen Proteinkinase B (Akt) einschließenden Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F induziert. Die Induktion der E2F-Aktivität ist ein wichtiger Kontrollpunkt bei der Zellzyklusprogression, die PI3 Kinase kann damit direkt in diesen Prozeß eingreifen (Brennan et al., 1997). Es wäre darum interessant, in Zukunft zu untersuchen, ob der Androgenrezeptor auch die Aktivierung dieses PI3 Kinasesignalwegs vermitteln kann.

Die PI3 Kinase stimuliert verschiedene Ras-abhängige zelluläre Prozesse (Hu et al., 1995, King et al., 1997) oder bewirkt über die neue (*novel*, n) PKC-Isoform ϵ die Aktivierung von Raf-1 (Toker et al., 1994, Cacace et al., 1996). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, daß ein PKC-Inhibitor oder die Verringerung der PKC-Expression durch TPA die Aktivierung von ERK 1 und ERK 2 durch DHT verhindert, spricht zugunsten der Beteiligung einer solchen nPKC-Isoform an diesem AR-Signalweg. Alternativ dazu wäre eine unabhängige Aktivierung von PKC und PI3 Kinase durch den DHT-beladenen AR denkbar, welche parallel zur Aktivierung der MAPK-Signaltransduktionskaskade führen könnte. Die Aktivierung von PKC α durch die estradiol-induzierte Freisetzung der *second messenger* DAG und IP₃ in menschlichen Hepatomazellen (Marino et al., 1998) und eine Beteiligung von PKC-Isoformen an der MAPK-Aktivierung durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol in promyeloischen Leukämiezellen wurden vor kurzem beschrieben. In letzterem Fall ist jedoch nicht bekannt, ob diese Wirkung durch den Vitamin D-Rezeptor vermittelt wird (Marcinkowska et al., 1997). Es ist also denkbar, daß der AR selbst, möglicherweise über einen Ca²⁺-abhängigen Weg, verschiedene klassische PKC-Isoformen aktiviert.

In Abbildung 18 sind die Aktivierungsschritte des Signaltransduktionswegs durch den AR im Cytoplasma, wie sie aus den Ergebnissen dieser Arbeit postuliert werden können, als Schema dargestellt.

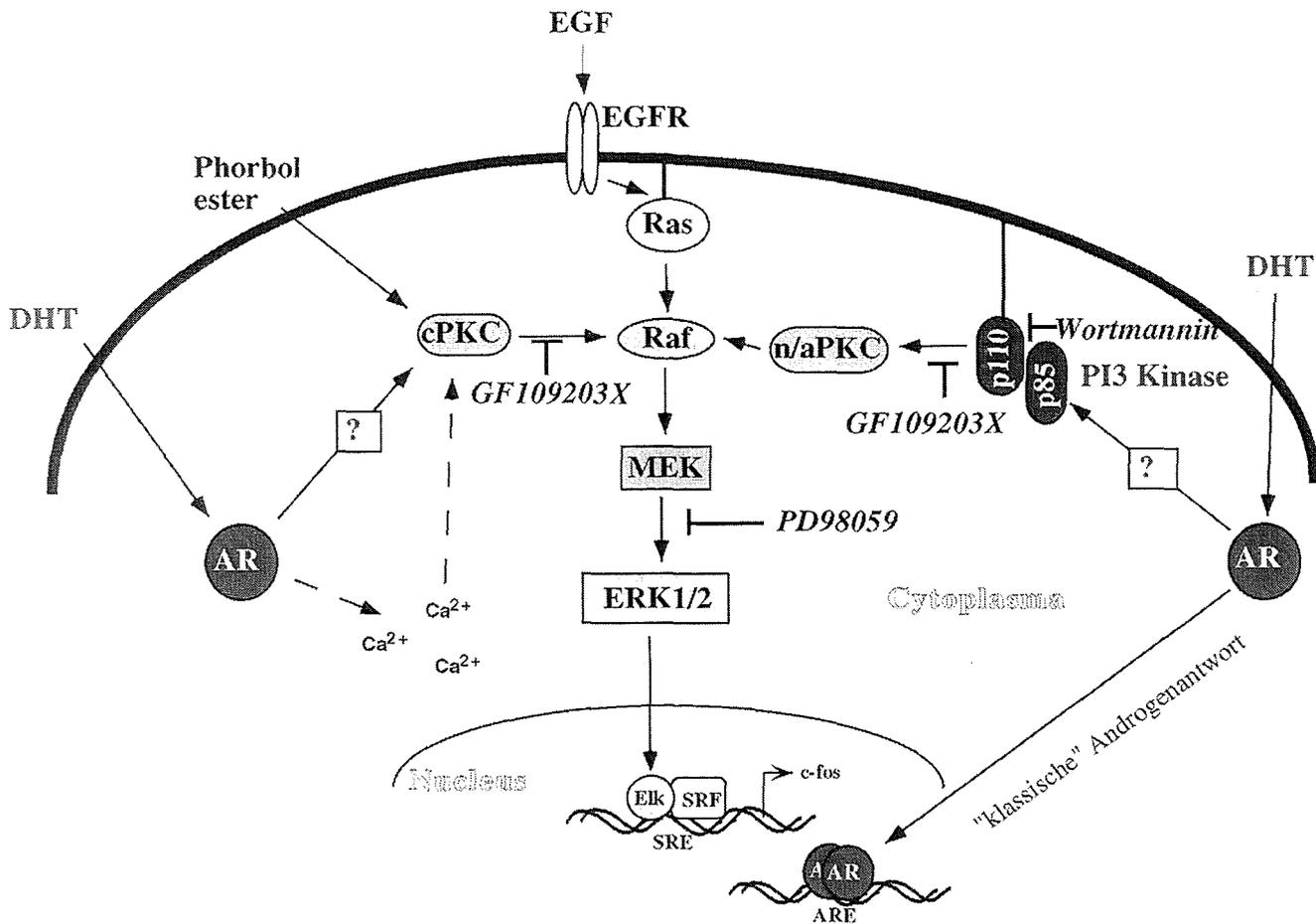


Abb. 18: Signaltransduktion durch den AR. Schematische Darstellung der möglichen Angriffspunkte des AR bei der ERK-Aktivierung. Kursiv gedruckt sind die Inhibitoren, welche die DHT-Antwort blockieren können. Der mittlere Teil der Abbildung zeigt vereinfacht den Signaltransduktionsweg, über den der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) bzw. Phorbol ester wie TPA zur Phosphorylierung der MAPKinasen ERK 1 und ERK 2 führen. AR, Androgenrezeptor; ARE, *androgen response element*; DHT, Dihydrotestosteron; EGF(R), epidermaler Wachstumsfaktor (-Rezeptor); cPKC, klassische (*classical*) Proteinkinase C; n/a PKC, neue (*novel*)/atypische PKC; PI3 Kinase, Phosphatidylinositol-3 Kinase; SRF, *serum response factor*; SRE, *serum response element*; GF 109203X, PKC-Inhibitor; PD98059, MEK-Inhibitor; Wortmannin, PI3 Kinaseinhibitor

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für die Hypothese, daß nach Androgenbindung ein Teil der AR-Moleküle „auf dem Weg“ in den Kern mit cytoplasmatischen Proteinen, wie z.B. der p85 regulatorischen Untereinheit der PI3 Kinase, interagiert. Es gibt mindestens zwei Arten der Aktivierung der PI3 Kinase. Eine davon beruht auf der direkten Interaktion von Proteinen mit der p85 Untereinheit und deren anschließende Tyrosinphosphorylierung. Die zweite am besten charakterisierte Art der PI3 Kinaseaktivierung ist die Assoziation der *src homology 2* (SH2) Domäne ihrer p85 Untereinheit mit dem Motiv Y*XXM (dabei bezeichnet Y* ein Phosphotyrosin, M steht für Methionin, X für eine beliebige Aminosäure) im cytoplasmatischen Teil von Zelloberflächenrezeptoren (Ward et al., 1996, Shimizu & Hunt, 1996). Diese Assoziation verstärkt die katalytische Aktivität der p85-assoziierten p110 Untereinheit der PI3 Kinase und führt zu ihrer Translokation an die Membran, wo sie mit Substraten und zusätzlichen Aktivatoren wie Ras interagieren kann (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Zwei solche YXXM-Motive befinden sich in der Hormonbindedomäne des AR. Sollte eines dieser Motive am Tyrosinrest phosphoryliert werden, so wäre der Rezeptor dadurch ein möglicher Aktivator der PI3 Kinase. Die Vermutung einer solchen Membranwirkung des AR wird unterstützt durch die Beobachtung eines spezifischen Signals an der Zellmembran von LNCaP-Zellen in Immunfluoreszenzexperimenten mit einem anti-AR-Antikörper (M. Becker, persönliche Mitteilung). Dies weist darauf hin, daß ein Teil des in den Zellen exprimierten klassischen AR direkt an der Zellmembran lokalisiert sein könnte. In dieser Arbeit konnte eine direkte Interaktion zwischen PI3 Kinase und Androgenrezeptor jedoch nicht gezeigt werden. Bisher wurde keine hormoninduzierte Tyrosinphosphorylierung des AR beobachtet, obwohl die DHT-induzierte ERK 1- und ERK 2-Phosphorylierung durch Genistein, einen Tyrosinkinaseinhibitor, gehemmt werden kann. Dies könnte jedoch auf die mangelnde Sensitivität der Detektionsverfahren zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit, diese Frage zu klären, wäre die Mutation der zwei YXXM-Motive im AR und die Untersuchung, ob die auf diese Weise mutierten Rezeptoren immer noch in der Lage sind, die MAPKinaseaktivität zu induzieren. Möglicherweise befinden sich die für die PI3 Kinaseaktivierung notwendigen Phosphotyrosinmotive aber auch auf einem anderen, mit dem AR assoziierten Protein. Einen Hinweis auf die Richtigkeit dieser Vermutung liefert die Beobachtung der Interaktion eines von p85 verschiedenen, tyrosinphosphorylierten Proteins mit dem AR nach 5 minütiger Behandlung von LNCaP-Zellen mit DHT (S. Mink, persönliche Mitteilung).

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, daß auch ER und PR die Phosphorylierung von ERK 1 und 2 vermitteln (Migliaccio et al., 1996, Migliaccio et al., 1998). Für den ER könnte der erste Schritt dieser Aktivierung eine Interaktion mit der cytoplasmatischen Proteinkinase Src sein. Für den PR wurde ein indirekter Mechanismus beschrieben. Nur als Heterodimer mit dem ER ist der PR zur ERK-Aktivierung fähig, beim PR sind für diese Dimerisierung vermutlich die äußersten 168 N-terminalen

Aminosäuren, beim ER der C-Terminus verantwortlich. Für den AR gibt es bisher noch keine Analyse darüber, ob eine Interaktion mit dem ER für die MAPK-Aktivierung notwendig ist. In den in dieser Arbeit verwendeten PC3-Zellen führte Behandlung mit Estradiol nicht zur Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Höhe der ER-Expression in diesen Zellen für eine Detektion der estradiol-induzierten ERK-Phosphorylierung ausreicht. Vorläufige Ergebnisse aus Transfektionsexperimenten mit N-terminalen Deletionsmutanten des AR weisen außerdem daraufhin, daß der N-Terminus des AR nicht für die Elk-1-Aktivierung notwendig ist (S. Mink, persönliche Mitteilung). Falls N-terminale Bereiche des AR für die Interaktion mit dem ER benötigt würden, wie es beim PR der Fall ist, würde dies die Notwendigkeit der Bildung eines ER/AR-Heterodimers für die Induktion der ERK-Phosphorylierung durch DHT ausschließen.

Es wäre jedoch ebenfalls vorstellbar, daß der AR selbst an Src binden und zu dessen Aktivierung führen könnte. Die *src homology 3* (SH3)-Domänen von cytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen wie Src oder der verwandten Proteine Fyn und Lck können an eine Prolin-reiche Domäne in der aminoterminalen Region der regulatorischen p85 Untereinheit der PI3 Kinase binden (Liu et al., 1993, Pleiman et al., 1993, Prasad et al., 1993). Diese Interaktion könnte der Mechanismus sein, durch den Src und andere cytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen die PI3 Kinase rekrutieren und aktivieren (zur Übersicht siehe Schlessinger, 1994). Bis jetzt wurde eine direkte Interaktion des AR mit Src jedoch noch nicht gezeigt. Ob die Androgenrezeptor-vermittelte PI3 Kinaseaktivierung auf einer solchen Wechselwirkung mit Src oder auf einem anderen Mechanismus beruht, muß in Zukunft geklärt werden.

4.2.2.3 Wirkung von Antiandrogenen

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den oben genannten Beobachtungen der ERK-Aktivierung durch ER oder ER/PR-Heterodimere und der in dieser Arbeit beschriebenen AR-vermittelten Aktivierung ist die Wirkung von Antihormonen. Antiestrogene bzw. Antiprogestine verhindern die Bindung an Src und die ERK-Phosphorylierung durch den ER bzw. das ER/PR-Heterodimer. Für den Androgenrezeptor konnte aber durch *Western blot*-Analysen und transiente Transfektionsexperimente, bei welchen ein Gal4-Elk-1 Fusionskonstrukt mit einem Gal4-Luciferasereporter coexprimiert wurde, gezeigt werden, daß Antiandrogene nicht nur die DHT-induzierte ERK-Aktivierung nicht hemmen, sondern sogar agonistisch wirken (Kapitel 3.2.5). Dabei zeigten Hydroxyflutamid und Cyproteronacetat einen stärkeren Effekt als Casodex.

Wie die ERK-Aktivierung durch Antihormone zustande kommt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Durch verschiedene Experimente muß in Zukunft diese Antiandrogenwirkung weiter analysiert werden. So wäre es von Bedeutung festzustellen, ob Tyrosinphosphorylierung auch für die Antiandrogen-induzierte ERK-Phosphorylierung notwendig ist, z.B. indem untersucht wird, ob mit Genistein die Antiandrogenantwort gehemmt werden kann. Außerdem muß aufgeschlüsselt werden, ob die durch Antiandrogene stimulierte Signaltransduktion über dieselben Zwischenschritte erfolgt wie die durch DHT-induzierte ERK-Phosphorylierung.

Für den Antiandrogeneffekt könnten auch gewebe- oder zelltypspezifische Unterschiede eine Rolle spielen, wie sie für die agonistische Wirkung von Antihormonen bei der genomischen Steroidrezeptorfunktion beschrieben wurden (Berry et al., 1990, Meyer et al., 1990, Webb et al., 1995, Katzenellenbogen et al., 1996). In diesem Zusammenhang muß genauer untersucht werden, ob die schnelle ERK-Aktivierung durch den Androgenrezeptor eine für Prostatazellen spezifische Funktion ist und ob es Unterschiede in der Wirkung von Antiandrogenen in Zellen der normalen Prostata und Prostatazellularzellen gibt.

Für Antiandrogene gibt es außer den hier beschriebenen experimentellen auch medizinische Hinweise, daß keine der heute verwendeten Substanzen ein reiner Antagonist ist. Dies ist im Fall der Behandlung von Mammakarzinomen mit Antihormonen anders. Bei Mammatumoren ist das Fehlen der Antwort auf Hormonablation gut mit einem Verlust der Estrogenrezeptor- (und Progesteronrezeptor-) Expression korreliert (Fisher et al., 1983). Außerdem wird in Mammatumorzellen die Rezeptorexpression durch das reine Antiestrogen ICI 182,780 herunterreguliert (Dauvois et al., 1992, McClelland et al., 1996). Bei Prostatazellularzellen gibt es jedoch keine solche Korrelation zwischen Androgenrezeptorstatus und der klinischen Hormonresponsivität, der AR wird in mehr als 80 % der Fälle von therapieresistenten Karzinomen exprimiert (Trachtenberg & Walsh, 1982, Benson et al., 1987, Sadi & Barrack,

1993, Ruizeveld de Winter et al., 1994). Eine mögliche Erklärung wäre die Beobachtung, daß neben Androgenen auch Antiandrogene, wie am Beispiel von Hydroxyflutamid gezeigt (Kemppainen & Wilson, 1996), eine Stabilisierung des Androgenrezeptorproteins bewirken können. Klinische Studien zeigten außerdem, daß bei einigen Prostatakrebspatienten in fortgeschrittenem Stadium ein Absetzen der Antiandrogentherapie eher zu einer Verbesserung als zur Verschlechterung der klinischen Symptome führt. Dieses als Antihormonentzugssyndrom bezeichnete Phänomen wurde für verschiedene Antiandrogene, darunter Casodex und Flutamid beobachtet (Small & Carrol, 1994, Scher und Kelly, 1993, zur Übersicht siehe Moul et al., 1995). Diese Beobachtungen weisen also auf unerwünschte (agonistische) Wirkungen der bisher verwendeten Antiandrogene hin. Die hier beobachtete Aktivierung der MAPKinasen ERK 1 und ERK 2 durch Androgenantagonisten könnte demnach eine Ursache für das Scheitern der Antiandrogentherapie sein. In Zukunft muß geklärt werden, welchen Anteil dieser AR-Signaltransduktionsweg an der Entstehung von Prostata Tumoren bzw. an ihrem Fortschreiten zum hormoninsensitiven Status hat. Diese Untersuchungen könnten einen wesentlichen Beitrag für die Suche nach Androgenantagonisten leisten, welche wirkungsvoller zum Stop des Tumorwachstums eingesetzt werden könnten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen zeigen, daß der Androgenrezeptor zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren gehört, die neben ihrer klassischen Funktion als Kernrezeptoren schnelle auch nicht-genomische Wirkungen besitzen. Durch diese Funktion kann der AR die Signaltransduktion in der Zelle beeinflussen, indem er cytoplasmatische Prozesse reguliert. Diese neue Wirkungsweise muß in Zukunft näher untersucht werden, wenn man die wachstumsregulierenden Effekte von Androgenen und Antiandrogenen besser verstehen möchte.

Abkürzungen

| | | | |
|-------------------------------------|---|--------|---|
| Abb. | Abbildung | ER | Estrogenrezeptor |
| AMV | <i>avian myoblastosis virus</i> | ERK | <i>extracellular signal-regulated kinase</i> |
| AP-1 | Aktivator-Protein 1 | ERM | <i>ets related molecule</i> |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat | et al. | et alii (und andere) |
| AR | Androgenrezeptor | EtOH | Ethanol |
| AR _{wt} | Wildtyp-Androgenrezeptor | FCS | Fötale Kälberserum |
| ARA ₇₀ | Androgenrezeptor-assoziiertes Protein (M _r = 70 kDa) | FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| ARE | <i>androgen response element</i> | g | Gramm |
| AS | Aminosäuren | g | relative Erdbeschleunigung |
| ATP | Adenosintriphosphat | G418 | Gentamycin |
| bp | Basenpaare | GAPDH | Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase |
| BSA | Rinderserumalbumin | GR | Glucocorticoidrezeptor |
| c | zellulär | GRE | <i>glucocorticoid response element</i> |
| CAIS | <i>complete androgen insensitivity</i> | GST | Gluthation-S-Transferase |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat | h | Stunde |
| CAT | Chloramphenicol-Acetyltransferase | hAR | menschlicher Androgenrezeptor |
| CBP | CREB-Bindeprotein | HBD | Hormon-Bindedomäne |
| CCS | mit Aktivkohle behandeltes FCS (<i>charcoal stripped calf serum</i>) | HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure |
| cDNA | zur RNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNA | HRE | <i>hormone response element</i> |
| Ci | Curie | Hsp | Hitzeschockprotein |
| cm | Zentimeter | IGF-I | <i>insulin-like growth factor-I</i> |
| cpm | radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>) | IκB | NF-κB-Inhibitor |
| CREB | <i>cAMP responsive element binding protein</i> | IL-6 | Interleukin 6 |
| C-Terminus | Carboxyterminus | JNK | cJun-N-terminale Kinase |
| dATP | 2'-Deoxyadenosintriphosphat (analog: dCTP, dGTP, dTTP) | KAc | Kaliumacetat |
| ddATP | 2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP) | kb | Kilobasen (1000 Basen) |
| DBD | DNA-Bindedomäne | kDa | Kilodalton |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat | KGF | Keratinocyten-Wachstumsfaktor |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron | l | Liter |
| DHT | Dihydrotestosteron | LBD | ligandenbindende Domäne |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium | LH | luteinisierendes Hormon |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | LHRH | Luteotropin-freisetzendes Hormon/ <i>luteinizing hormone releasing hormone</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| DTT | Dithiothreitol | M | molar |
| E | Extinktion | mA | Milliampere |
| E ₂₆₀ , E ₂₈₀ | Extinktion bei 260 bzw. 280 nm | MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| ECL | <i>enhanced chemoluminescence</i> | MEK | MAPK/ERK-Kinase |
| E.coli | Escherichia coli | MBq | Megabequerel |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | mCi | Millicurie |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor | μF | Mikrofarad |
| EGTA | Ethylenglykol-bis (2-Amino-ethylether)- -Tetraessigsäure | mg | Milligramm |
| | | μg | Mikrogramm |
| | | min | Minuten |
| | | ml | Milliliter |
| | | μl | Mikroliter |
| | | mM | millimolar |

Abkürzungen

| | | | |
|------------|---|-------|---|
| μM | mikromolar | SAPK | <i>stress-activated protein kinase</i> |
| MMTV | Maus Mamma Tumor Virus | SBMA | spinale und bulbäre Muskelatrophie |
| MOPS | N-Morpholinopropansulfonsäure | SDS | Natriumdodecylsulphat |
| MR | Mineralocorticoidrezeptor | sec | Sekunden |
| mRNA | Boten-RNA | SH | <i>Src homology</i> |
| Na-Acetat | Natriumacetat | SRE | <i>serum response element</i> |
| NF-κB | <i>nuclear factor-κB</i> | SRF | <i>serum response factor</i> |
| ng | Nanogramm | SRY | <i>sex-determining region of Y chromosome</i> |
| NLS | Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>) | SSC | <i>standard saline citrate</i> |
| nM | nanomolar | SV40 | <i>simian virus 40</i> |
| nm | Nanometer | Tab. | Tabelle |
| nt | Nucleotide | TAF | Transaktivierungsfunktion |
| NP-40 | Nonidet P-40 | TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| N-Terminus | Aminoterminus | TCF | <i>ternary complex factor</i> |
| OD | optische Dichte | TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | TIF2 | <i>transcriptional mediator/intermediary factor 2</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung | TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat |
| PI3 Kinase | Phosphatidylinositol 3-Kinase | TR | Tyroidhormonrezeptor |
| PKC | Proteinkinase C | TRITC | Tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat |
| pmol | Pikomol | Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl-Fluorid | tRNA | Transfer-RNA |
| PR | Progesteronrezeptor | U | Enzymeinheiten (Units) |
| PVDF | Polyvinyliden-Difluorid | UV | Ultraviolette Strahlung |
| RAR | Retinsäurerezeptor | V | Volt |
| RXR | 9-cis Retinsäurerezeptor | v/v | Volumen pro Volumen |
| RLU | relative light units | VDR | Vitamin D-Rezeptor |
| RNA | Ribonukleinsäure | wt | Wildtyp |
| RNAse | Ribonuklease | w/v | Masse pro Volumen |
| rNTP | Ribonukleosidtriphosphat | z.B. | zum Beispiel |
| RSV | Rous Sarkoma Virus | | |
| RXR | 9-cis Retinsäurerezeptor | | |

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

Literatur

- Aarnisalo, P., Palvimo, J.J. & Jänne, O.A. (1998). CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2122-2127
- Adams, P.D. & Parker, P.J. (1991). TPA-induced activation of MAP kinase. *FEBS Lett.* **290**, 77-82
- Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K. & Krebs, E.G. (1991). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade: *in vitro* activation of myelin basic protein-1 microtubule associated protein-2 kinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 4220-4227
- Ahn, N.G., Seger, R. & Krebs, E.G. (1992). The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 992-999
- Akimoto, D., Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Kimura, K., Fukui, Y., Osada, S.-i., Mizuno, K., Hirai, S.-i., Kazlauskas, A. & Ohno, S., (1996). EGF or PDGF receptors activate atypical PKC λ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* **15**, 788-798
- Avruch, J., Zhang, X.F. & Kyriakis, J.M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 279-283
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643
- Barrack, E.R. & Tindall, D.J. (1987). A critical evaluation of the use of androgen receptor assays to predict the androgen responsiveness of prostatic cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* **239**, 155-187
- Barrack, E.R. (1996). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Mt. Sinai J. Med* **63**, 403-412
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344
- Bélanger, A., Giasson, M., Couture, J., Dupont, A., Cusan, L. & Labrie, F. (1988). Plasma levels of hydroxyflutamide in patients with prostatic cancer receiving the combined hormonal therapy: an LHRH agonist and flutamide. *Prostate* **12**, 79-84
- Bélanger, B., Bélanger, A., Labrie, F., Dupont, A., Cusan, L., & Monfette, G. (1989). Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *J. Steroid. Biochem.* **32**, 695-698
- Bellido, T., Jilka, R.L., Boyce, B.F., Girasole, G., Broxmeyer, H., Dalrymple, S.A. Murray, R. & Manolagas, S.C. (1995). Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgen. The role of the androgen receptor. *J. Clin. Invest.* **95**, 2886-2895
- Benson, R.C., Gorman, P.A., O'Brian, P.C., Holicky, E.L. & Veneziale, C.M. (1987). Relationship between androgen receptor binding activity in human prostate cancer and clinical response to endocrine therapy. *Cancer* **59**, 1599-1606
- Benten, W.P.M., Lieberherr, M., Sekeris, C.E. & Wunderlich, F. (1997). Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* **407**, 211-214

- Berrevoets, C.A., Veldscholte, J. & Mulder, E. (1993). Effects of antiandrogens on transformation and activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 731-736
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
- Berry, M., Metzger, D. & Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* **9**, 2811-2818
- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. & Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* **348**, 448-???
- Bjorge, J.D., Chan, T.-O., Antczak, M., Kung, H.-J. & Fujita, D.J. (1990). Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3816-3820
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., De Pinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. & Yancopoulos, G.D. (1991). ERK's: a family of protein serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer & Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* **375**, 377-382
- Brennan, P., Babbage, J.W., Burgering, B.M.T., Groner, B., Reif, K. & Cantrell, D.A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* **7**, 679-689
- Brinkmann, A.O., Jenster, G., Kuiper, G.G., Ris, C., van Laar, J.H., van der Korput, J.A., Degenhart, H.J., Trifiro, M.A., Pinsky, L. & Romalo, G. (1992). The human androgen receptor structure/function relationship in normal and pathological situations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 361-368
- Brooks, B.P., Paulson, H.L., Merry, D.E., Salazar-Gruoso, E.F., Brinkmann, A.O., Wilson, E.M. & Fischbeck, K.H. (1997). Characterization of an expanded glutamine repeat androgen receptor in a neuronal cell culture system. *Neurobiol. Dis.* **4**, 313-323
- Brown, C.J., Goss, S.J., Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Wilson, E.M., French, F.S. & Willard, H.F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 264-269
- Bruchofsky, N., Lesser, B., Vandoorn, E. & Cravens, S. (1975). Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam. Horm.* **33**, 61-102
- Bruder, J.T., Heidecker, G. & Rapp, U. (1992). Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev.* **6**, 545-556
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, Öhmann, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A., & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758
- Buttayan, R. (1991). Genetic response of prostate cells to androgen deprivation - insights into cellular mechanisms of apoptosis. In: L. D. Tomei and F. O. Cope (eds.). *Apoptosis: the molecular basis of cell death*, 157-173
- Cacace, A.M., Ueffing, M., Philipp, A., Han, E.K.-H., Kolch, W. & Weinstein, I.B. (1996). PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* **13**, 2517-2526

- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J.M. & Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev.* **11**, 3351-3364
- Cano, E. & Mahadevan, L.C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117-122
- Carpenter, C.L. & Cantley, L.C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 153-158
- Carter, H.B., Piantadosi, S. & Isaacs, J.T. (1990). Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J. Urol.* **143**, 742-746
- Carter, H.B. & Coffey, D.S. (1990). The Prostate: an increasing medical problem. *Prostate* **16**, 39-48
- Cato, A.C.B., Henderson, D. & Ponta, H. (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* **6**, 363-368
- Chang, C., Kokontis, J. & Liao, S. (1988). Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**, 324-326
- Chao, T.-S., Byron, K., Lee, K.-M., Villereal, M. & Rosner, M. (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **267**, 19876-19883
- Claessens, F., Alen, P., Devos, A., Peeters, B., Verhoeven, G. & Rombauts, W. (1996). The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 19013-19016
- Claessens, F., Celis, L., Peeters, B., Heyns, W., Verhoeven, G. & Rombauts, W. (1989). Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 833-840
- Clay, C.M., Keri, R.A., Finicle A.B., Heckert, L.L., Hamernik, D.L., Marschke, K.M., Wilson, E.M., French, F.S. & Nilson, J.H. (1993). Transcriptional repression of the glycoprotein hormone α subunit gene by androgen may involve binding of androgen receptor to the proximal promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 13556-13564
- Corbin, A. (1982). From contraception to cancer: a review of the therapeutic applications of LHRH analogs as antitumor agents. *Yale J. Biol. Med.* **55**, 27-47
- Crawford, E.D., Blumenstein, B.A., Goodman, P.D., Davis, M.A., Eisenberger, M.A., McLeod, M.G., Spaulding, J.T., Benson, R. & Dorr, F.A. (1990). Leuprolide with and without flutamide in advanced prostate cancer. *Cancer* **66**, 1039-1044
- Crawford, E.D., Eisenberger, M., McLeod, D.G., Spaulding, J.T., Benson, R., Dorr, F.A., Blumenstein, B.A., Davis, M.A. & Goodman, P. (1989). A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *New Engl. J. Med.* **321**, 419-424
- Crocitto, L.E., Henderson, B.E. & Coetze, G.A. (1997). Identification of two germline point mutations in the 5'UTR of the androgen receptor gene in men with prostate cancer. *J. Urol.* **158**, 1599-1601
- Cronauer, M.V., Eder, I.E., Hittmair, A., Sierek, G., Hobisch, A., Culig, Z., Thurnher, M., Bartsch, G. & Klocker, H. (1998). A reliable system for the culture of human prostatic cells. *In vitro* (im Druck)

- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Cato, A.C.B., Hittmair, A., Radmayr, C., Eberle, J., Bartsch, G. & Klocker, H. (1993a). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1541-1550
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Hittmair, A., Radmayr, C., Bartsch, G. & Klocker, H. (1995). Activation of the androgen receptor by polypeptide growth factors and cellular regulators. *World J. Urol.* **13**, 285-289
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G. & Klocker, H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* **54**, 5474-5478
- Culig, Z., Klocker, H., Eberle, J., Kaspar, F., Hobisch, A., Cronauer, M.V. & Bartsch, G. (1993b). DNA sequence of the androgen receptor in prostate tumor cell lines and tissue specimens assessed by means of the polymerase chain reaction. *Prostate* **22**, 11-22
- Culig, Z., Stober, J., Gast, A., Peterziel, H., Hobisch, A., Radmayr, C., Hittmair, A., Bartsch, G., Cato, A.C.B. & Klocker, H. (1996). Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev.* **20**, 68-75
- Cunha, G., Donjacour, A., Cooke, P., Mee, S., Bigsby, R., Higgins, S. & Sugimura, Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* **8**, 338-362
- Curran, T., Peters, G., van Beveren, C., Teich, N.M. & Verma, I. M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.* **44**, 674-682
- Dauvois, S., Danielian, P.S., White, R. & Parker, M.G. (1992). Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 4037-4041
- Davies, P. & Eaton, C.L. (1991). Regulation of prostate growth. *J. Endocrinol.* **131**, 5-17
- de Vos, P., Claessens, F., Winderickx, J., Van Dijck, P., Celis, L., Peeters, B., Rombauts, W., Heyns, W. & Verhoeven, G. (1991). Interaction of androgen response elements with the DNA-binding domain of the rat androgen receptor expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 3439-3443
- 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.
- Derijard, B.B., Hibi, W., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. & Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1027
- Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fry, M.J., Yonezawa, K., Kasuga, M. & Waterfield, M.D. (1994). PI3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *EMBO J.* **13**, 511-521
- Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, S.J. & Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7686-7689
- Elo, J.P., Kvist, L., Leinonen, K., Isomaa, V., Henttu, P., Lukkarinen, O. & Vihko, P. (1995). Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3494-3500

- Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K.-i., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S. & Kawashima, H. (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 99-102
- Eul, J., Meyer, M.E., Tora, L., Bocquel, M.T., Quirin-Stricker, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1989). Expression of active hormone and DNA-binding domains of the chicken progesterone receptor in *E. coli*. *EMBO J.* **8**, 83-90
- Evans, B.A., Harper, M.E., Daniells, C.E., Watts, C.E., Matenhelia, S., Green, J. & Griffiths, K. (1996). Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* **28**, 162-171
- Fabbro, D., Regazzi, R., Costa, S.D., Borner, C. & Eppenberger, U. (1986). Protein kinase C desensitization by phorbol esters and its impact on growth of human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **135**, 65-73
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. & Johnson, G.L. (1997). MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino terminal kinases? *Curr. Opin. Gen. Development* **7**, 67-74
- Farhat, M.Y., Abi-Younes, S. & Ramwell, P.W. (1996). Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 571-576
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**, 6-13
- Fejes-Toth, G., Pearce, G. & Naray-Fejes-Toth, A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2973-2978
- Fenton, M.A., Shuster, T.D., Fertig, A.M., Taplin, M.-E., Kolvenbag, G., Bubley, G.J. & Balk, S.P. (1997). Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1383-1388
- Fisher, B., Redmond, C., Brown, A. & NSABP investigators. (1983). Influences of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the responses to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **1**, 227-241
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, 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. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* **13**, 129-145
- Fuhrmann, U., Parczyk, K., Klotzbücher, M., Klocker, H. & Cato, A.C.B. (1997). Recent developments in molecular action of antihormones. *J. Mol. Med.* (im Druck)
- Geissler, J.F., Traxler, P., Regenass, U., Murray, B.J., Roesel, J.L., Meyer, T., McGlynn, E., Storni, A. & Lydon, N.B. (1990). Thiazolidine-diones. Biochemical and biological activity of a novel class of tyrosine protein kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**, 22255-22261
- Geller, J., Albert, J.D., Nachtsheim, D.A. & Loza, D. (1984). Comparison of prostatic cancer tissue dihydrotestosterone levels at the time of relapse following orchiectomy or estrogen therapy. *J. Urol.* **132**, 693-696
- Gelmann, E.P. (1996). Androgen receptor mutations in prostate cancer. In William N. Hait (ed.) *Cancer Treatment and Research - Drug Resistance*, 285-302

- Gerber, H.-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M. Hug, M., Rusconi, R. & Schaffner, W. (1994). Transactivation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-811
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H. & Shaw, P.E. (1995a). ERK phosphorylation potentiates Elk-1 mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* **14**, 951-962
- Gille, H., Strahl T. & Shaw, P.E. (1995b). Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr. Biol.* **5**, 1191-1200
- Globe, M., Smith, J. & The Leuprolide Study Group (1987). Long term suppression of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone by daily administration of leuprolide. *J. Urol.* **137**, 57-60
- Gorczyńska, E. & Handelsman, D.J. (1991). The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 23739-23744
- 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.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P & Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250
- Gupta, S. & Davis, R.J. (1994). MAP kinase binds to the NH₂-terminal activation domain of c-Myc. *FEBS Lett.* **353**, 281-285
- Gutman, A. & Wasylyk, B. (1990). *EMBO J.* **9**, 2241-2246
- Ham, J., Thomson, A., Neddham, M., Webb, P. & Parker, M (1988). Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus. *Nucl. Acids. Res.* **16**, 5263-5277
- Han, J., Bibbs, L. & Ulevitch, R.J. (1994), A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808-811
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of *E. coli*. In *DNA cloning*. (D.M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, **1**, 109-135.
- Hazan, I., Dana, R., Granot, Y. & Levy, R. (1997). Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase. *Biochem. J.* **326**, 867-876
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Göttlicher, M., Herrlich, P. & Cato, A.C.B.(1997). IκBα independent downregulation of NF-κB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **16**, 4698-4707.

- Heckert, L.L., Wilson, E.M. & Nilson, J.H. (1997). Transcriptional repression of the α -subunit gene by androgen receptor occurs independently of DNA binding but requires the DNA-binding and ligand-binding domains of the receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1497-1506
- Hobisch, S., Culig, Z., Radmayr, C., Bartsch, G., Klocker, H. & Hittmair, A. (1995). Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res.* **55**, 3068-3072
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Ming Chu, T., Mirand, E.A. & Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809-1818
- Housley, P.R., Sanchez, E.R., Danielsen, M., Ringold, G.M. & Pratt, W.B. (1990). Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two site model for hsp90 binding to the steroid-binding domain. *J. Biol. Chem.* **265**, 12778-12781
- Hu, W., Kippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J. & Lewis, L.T. (1995). Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* **268**, 100-102
- Huggins, C & Hodges, C.V. (1941). Studies on prostatic cancer. 1. The effects of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* **1**, 293-297
- Huggins, C. and Stevens, R.A. (1940). The effect of castration on benign hypertrophy of the prostate in man. *J. Urol.* **43**, 705-714
- Ikonen, T., Palvimo, J.J., Kallio, P.J., Reinikainen, P., Jänne, O.A. (1994). Stimulation of androgen-regulated transactivation by modulators of protein phosphorylation. *Endocrinology* **135**, 1359-1366
- Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gauthier, T. & Peterson, R.E. (1974). Steroid 5 α -reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* **186**, 1213-1215
- 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 and SMRT. *Mol. Endocrinol.* **11**, 693-705
- Jackson, T.R., Stephens, L.R. & Hawkins, P.T. (1992). Receptor specificity of growth factor-stimulated synthesis of 3-phosphorylated inositol lipids in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 16627-16636
- Jenster, G., Trapmann, J. & Brinkmann, A.O. (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem. J.* **293**, 761-768
- Jenster, G., van der Korput, H.A.G.M. van Vroonhoven, C., van der Kwast, T.H., Trapman, J. & Brinkmann, A.O. (1991). Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1396-1404
- Jones, K.T. & Sharpe, G.R. (1994). Intracellular free calcium and growth changes in single human keratinocytes in response to vitamin D and five 20-epi-analogues. *Arch. Dermatol. Res.* **286**, 123-129

- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophysical hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* **8**, 379-389
- Kaighn, M.E., Shankar Narayan, K., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. & Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16-23
- Kallio, P.J., Jänne, O.A. & Palvimo, J.J. (1994). Agonists, but not antagonists, alter the conformation of the hormone-binding domain of androgen receptor. *Endocrinology* **134**, 998-1001
- Kallio, P.J., Poukka, H., Moilanen, A., Jänne, O.A. & Palvimo, J.J. (1995). Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol. Endocrinol.* **9**, 1017-1028
- Kamano, H., Burk, B., Noben-Trauth, K. & Klempnauer, K.-H. (1995). Differential splicing of the mouse B-myb gene. *Oncogene* **11**, 2575-2582
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 16843-16846
- Kassen, A., Sutkowski, D.M., Ahn, H., Sensibar, J.A., Kozlowski, J.M & Lee, C. (1996). Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate* **28**, 89-97
- Katzenellenbogen, J.A., O'Malley, B.W. & Katzenellenbogen, B.S. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* **10**, 119-131
- Kazlauskas, A. (1994). Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **4**, 5-14
- 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**, 26276-26275
- Kempainen, J.A. & Wilson, E.M. (1996). Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urology* **48**, 157-163
- Kempainen, J.A., Lane, M.V., Sar, M. & Wilson, E.M. (1992). Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation: specificity for steroids and antihormones. *J. Biol. Chem.* **267**, 968-974
- Kennedy, M. (1989). Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci.* **12**, 417-420
- Kennedy, W.R., Alter, M. & Sung, J.H. (1968). Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* **18**, 671-680
- King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N. & Brugge, J.S. (1997). Phosphatidylinositol-3 kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4406-4418
- Kleinerman, D.I., Troncoso, P., Pisters, L.L., Navone, N.M. Hsieh, J.-T., Logothetis, C.J., von Eschenbach, A.C., Sleddens, H.F.B.M., van der Kwast, T.H., Brinkmann, A.O., Schroeder, F.H. & Trapman, J. (1996). Expression and structure of the androgen receptor in bone metastases of hormone refractory prostate cancer. *J. Urol.* **155**, 626A

- Klein-Hitpass, L., Tsai, S.Y., Weigel, N.L., Allan, G.F., Riley, D., Rodriguez, R., Schrader, W.T., Tsai, M.J. & O'Malley, B.W. (1990). The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell* **60**, 247-257
- Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T. & Kallioniemi, O.-P. (1997). Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* **57**, 314-319
- Kokontis, J., Takakura, K., Hay, N. & Liao, S. (1994). Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Cancer Res.* **54**, 1566-1573
- Kortenjann, M. & Shaw, P.E. (1995). The growing family of MAP kinases: Regulation and specificity. *Crit. Rev. Oncogen.* **6**, 99-115
- Krieg, M., Bartsch, W., Janssen, W., Voight, K.D. (1979). A comparative study of binding, metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J. Steroid Biochem.* **11**, 615-624
- Krypta, R.M., Hemming, A. & Coutneidge, S. A. (1988). Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**, 3837-3844
- Kuil, C.W. & Mulder, E. (1994). Mechanism of antiandrogen action: conformational changes of the receptor.
- Kumar, V. & Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**, 145-156
- Kyprianou, N. & Isaacs, J.T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat prostate after castration. *Endocrinology* **122**, 552-562
- Kyprianou, N., English, H.F. & Isaacs, J.T. (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res.* **50**, 3748-3753
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. & Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. & Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* **352**, 77-79
- Labrie, F., Bélanger, A., Dupont, A., Luu The, V., Simard, J. & Labrie, C. (1993). Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin. Invest. Med.* **16**, 475-492
- Labrie, F., Dupont, A., Bélanger, A., Cusan, L., Lacourciere, Y., Monfette, G., Laberge, J.G., Emond, J.P., Fazekas, A.T., Raynaud, J.P. & Husson, J.M. (1982). New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. *Clin. Invest. Med.* **5**, 267-275
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Landström, M., Damber, J.-E. & Bergh, A., (1994). Prostatic tumor regrowth after initially successful castration therapy may be related to a decreased apoptotic cell death rate. *Cancer Res.* **54**, 4281-4284

- Lee, J.-E., Beck, T.W., Wojnowski, L. & Rapp, U.R. (1996). Regulation of A-raf expression. *Oncogene* **12**, 1669-1677
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heyes, J.R. & Landvatter, S.W. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosyntheses. *Nature* **372**, 739-746
- Léger, J.G., Montpetit, M.L. & Tenniswood, M.P. (1987). Characterization and cloning of androgen repressed mRNA from rat ventral prostate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 196-203
- Lieberherr, M. & Grosse, B. (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1, 4, 5,-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 7217-7223
- Liu, X., Marengere, L.C.E., Koch, C.A., & Pawson, T. (1993). The v-Src SH3 domain binds to phosphatidylinositol 3-Kinase in T Cells. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5225-5232
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lubahn, D.B., Brown, T.R., Simental, J.A., Higgs, H.N., Migeon, C.J., Wilson, E.M. & French, F.S. (1989). Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9534-9538
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H.N., Larson, R.E., French, F.S. & Wilson, E.M. (1988). The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.* **2**, 1265-1275
- Mao, C., Ray-Gallet, D., Tavitian, A. & Moreau-Gachelin, F. (1996). Differential phosphorylations of Spi-B and Spi-1 transcription factors. *Oncogene* **12**, 863-873
- Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393
- Marcinkowska, E., Wiedlocha, A. & Radzikowski, C. (1997). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induced activation and subsequent nuclear translocation of MAPK is upstream regulated by PKC in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 419-426
- Marino, M., Pallottini, V & Trentalance, A. (1998). Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC-a signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 254-258
- Marshall, C.J. (1996). Raf gets it together. *Nature* **383**, 127-128
- Masai, M., Sumiya, H., Akimoto, S., Yatani, R., Chang, C., Liao, S. & Shimazaki, J. (1990). Immunohistochemical study of androgen receptor in benign hyperplastic and cancerous human prostates. *Prostate* **17**, 293-300
- McClelland, R.A., Gee, J.M.W., Francis, A.B., Robertson, J.F.R., Blamey, R.W., Wakeling, A.E. & Nicholson R.I. (1996). Short-term effects of pure anti-estrogen ICI 182780 treatment on oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha protein expression in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* **32A**: 413-416
- McEwan, I.J. & Gustafsson, J.-Å. (1997). Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8485-8490

- Merrit, J., McCarthy, S., Davies, M. & Moores, K. (1990). Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. *Biochem. J.* **269**, 513-519
- Meyer, M.E., Pomon, A., Ji, J., Bocquel, M.-T., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1990). Agonistic and antagonist activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J.* **9**, 3923-3932
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. & Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15**, 1292-1300
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M. & Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21^{ras}/ERK pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* **17**, 2008-2018
- Milella, M., Gismondi, A., Roncaioli, P., Bisogno, L., Palmieri, G., Frati, L., Cifone, M.G. & Santoni, A. (1997). CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A2 (PLA2) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA2, in CD16-triggered granule exocytosis. *J. Immunol.* **158**, 3148-3154
- Morelli, S., Boland, A.R. & Boland, R.L. (1993). Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem. J.* **289**, 675-679
- Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K. & Schwartz, J. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* **131**, 1305-1312
- Moul, J.W., Srivastava, S. & McLeod, D.G. (1995). Molecular implications of the antiandrogen withdrawal syndrome. *Sem. Urol.* **13**, 157-163
- Nazareth, L.V. & Weigel, N. L. (1996). Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 19900-19907
- Nel, A.E., Pollack, S., Landreth, G., Lebetter, J.A., Hultin, L., Williams, K., Katz, R. & Akerley, B. (1990). CD-3-mediated activation of MAP-2 kinase can be modified by ligation to the CD4 receptor. Evidence for tyrosine phosphorylation during activation of this kinase. *J. Immunol.* **145**, 971-979
- Neumann, F & Töpert, M. (1986). Pharmacology of antiandrogens. *J. Steroid Biochem.* **25**, 885-895
- Neuschmid-Kaspar, F., Gast, A., Peterziel, H., Schneikert, J., Muigg, A., Ransmayr, G., Klocker, H., Bartsch, G. & Cato, A.C.B. (1996). CAG-repeat expansion in androgen receptor in Kennedy's disease is not a loss of function mutation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **117**, 149-156
- Newmark, J.R., Hardy, D.O., Tonb, C.C., Carter, B.S., Epstein, J.I., Issacs, W.B., Brown, T.R. & Barrack, E.R. (1992). Androgen receptor-gene mutations in human prostate cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 6319-6323
- Nichols, M., Rientjes, J.M.J. & Stewart, A.F. (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J.* **17**, 765-773
- Nomura, A.M. & Kolonel, L.N. (1991). Prostate cancer: a current perspective. *Am. J. Epidemiol.* **133**, 200-227

- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H. Timmers, H.T.M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J.L., Van der Eb, A.J. & Herrlich, P. (1990). A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**, 527-538
- 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
- Palvimo, J.J., Kallio, P.J., Ikonen, T., Mehto, M., Janne, O.A. (1993). Dominant negative regulation of trans-activation by the rat androgen receptor: roles of the N-terminal domain and heterodimer formation. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1399-1407.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. & Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation site in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAPK). *EMBO J.* **10**, 885-892
- Persson, H., Ayer-Le Lievre, C., Soder, O. Villar, M.J., Metsis, M., Olson, L., Ritzen, M. & Hokfelt, T. (1990). Expression of β -nerve growth factor mRNA in sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* **247**, 704-707
- Peterziel, H., Culig, Z., Stober, J., Hobisch, A., Radmayr, C., Bartsch, G., Klocker, H. & Cato, A.C.B. (1995). Mutant androgen receptors in prostatic tumors distinguish between amino-acid sequence requirements for transactivation and ligand binding. *Int. J. Cancer* **63**, 544-550
- Pleiman, C.M., Clark, MR., Timson-Gauen, L.K., Winitz, S., Coggeshall, K.M., Johnson, G.L., Shaw, A.S. & Cambier, J.C. (1993). Mapping of sites on the src family protein tyrosine kinases, p55^{blk}, p59^{fyn}, p56^{lyn}, which interact with the effector molecules, phospholipase C-a2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5877-5887
- Prasad, K.V.S., Janssen, O., Kapeller, R., Raab, M., cantley, L.C., Rudd, C.E. (1993). Src homology 3 domain of protein tyrosine kinase p59^{fyn} mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7366-7370
- Price, M.A., Rogers, A.E. & Treisman, R. (1996). The p38 and ERK MAP kinase pathways co-operate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* **15**, 6552-6563
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M. & French, F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* **16**, 271-321
- Rahmsdorf, H.J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U. und Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1643-1659
- Rapp, U.R. (1991). Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene* **6**, 495-500
- Ray, L.B. & Sturgill, T.W. (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1502-1506
- Raynaud, J.-P. & Ojasoo, T. (1986). The design and use of sex-steroid antagonists. *J. Steroid Biochem.* **25**, 811-833
- Reinikainen, P., Palvimo, J.J. & Jänne, O.A (1996). Effects of mitogens on androgen receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* **137**, 4351-4357

- Renaud, J.-P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR γ -ligand binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-689
- Rijkers, G., Justement, L., Griffioen, A. & Cambier, J. (1990). Improved method for measuring intracellular Ca⁺⁺ with fluo-3. *Cytometry* **11**, 923-927
- Ris-Stalpers, C., Verleun-Mooijman, M.C.T., Trapman, J. & Brinkmann, A.O. (1993). Threonine on amino acid position 868 in the human androgen receptor is essential for androgen binding specificity and functional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 173-180
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.I., Waterfield, M.D. & Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532
- Rosen, L., Ginty, D., Weber, M. & Greenberg, M. (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of ras. *Neuron* **12**, 1207-1221
- Ruizeveld de Winter, J.A., Janssen P.J.A., Sleddens, H.F.B.M., Verleun-Mooijman, M.C.T., Trapman, J., Brinkmann, A.O., Santerse, A.B., Schröder, F.H. & van der Kwast, T.H. (1994). Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **144**, 735-746
- Sadi, M.V. & Barrack, E.R. (1993). Image analysis of androgen receptor immunostaining in metastatic prostate cancer. Heterogeneity as a predictor of response to hormonal therapy. *Cancer* **71**, 2574-2580
- Sadi, M.V., Walsh, P.C & Barrack, E.R. (1991). Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. *Cancer* **67**, 3057-3064
- Sager, R. (1989). Tumor suppressor genes: The puzzle and the promise. *Science* **246**, 1406-1412
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sartorius, C.A., Tung, L., Takimoto, G.S. & Horwitz, K.B. (1993). Antagonist-occupied human progesterone receptors bound to DNA are functionally switched to transcriptional agonists by cAMP. *J. Biol. Chem.* **5**, 9262-9266
- Scher, H.I. & Kelly, W.K. (1993). Flutamide withdrawal syndrome: Its impact on clinical trials in hormone-refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **11**, 1566-1572
- Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **4**, 25-30
- Schmitz, M.L. & Baeuerle, P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activity potential of NF-kB. *EMBO J.* **10**, 3805-3817
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P.-A., Klocker, H., de Launoit, Y. & Cato, A.C.B. (1996). Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 23907-23913
- Schoenberg, M.P., Hakimi, J.M., Wang, S., Bova, G.S., Epstein, J.I., Fischbeck, K.H., Isaacs, W.B., Walsh, P.C. & Barrack, E.R. (1994). Microsatellite mutation (CAG_{24->18}) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 74-80

- Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. & Parker, P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 790-798
- Schowalter, D.B., Sullivan, W.P., Maihle, N.J., Dobson, A.D., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. & Toft, D.O. (1991). Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 21165-21173
- Schulman, H. (1993). Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 247-253
- Schuermans, A.L.G., Bolt, J., Voorhorst, M., Blankenstein, M.A. & Mulder, E. (1988). Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate-tumour cell line LNCaP - high affinity for progestagenic and estrogenic steroids, *Int. J. Cancer* **42**, 917-922
- Sensibar, J.A., Liu, X., Patai, B., Alger, B. & Lee, C. (1990). Characterization of castration-induced cell death in the rat prostate by immuno-histochemical localization of cathepsin D. *Prostate* **16**, 263-276
- Shapiro, E. (1990). Embryologic development of the prostate. Insights into the etiology and treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. North Am.* **17**, 487-493
- Shimizu, Y. & Hunt, S.W. (1996). Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI3-kinase? *Immunol. Today* **17**, 565-576
- Siiteri, P.K. & Wilson, J.D. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J. Clin. Endocr. Metab.* **38**, 113-125
- Simental, J.A., Sar, M. & Wilson, E.M. (1992). Domain functions of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 37-41
- Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S. & Wilson, E.M. (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 510-518
- Small, E.J. & Carroll, P.R. (1994). Prostate-specific antigen decline after Casodex withdrawal. Evidence for an antiandrogen withdrawal syndrome. *Urology* **43**, 408-410
- 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.F. & Toft, D.O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* **7**, 4-11
- Steinsapir, J., Socci, R. & Reinach, P. (1991). Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 90-96
- Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E. & Maller, J.L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**, 715-718
- Su, B. & Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 402-411
- Suzuki, H., Sato, N., Watabe, Y., Masai, M., Seino, S. & Shimazaki, J. (1993). Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 759-765

- Takebe, T., Seiki, M., Fujisana, J.-I., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K.-I., Yoshida, M. & Arai, N. (1988). SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 466-472
- Tan, J.-a., Sharief, Y., Hamil, K.G., Gregory, C.W., Zang, D.-Y., Sar, M., Gumerlock, P.H., deVere White, R.W., Pretlow, T.G., Harris, S.E., Wilson, E.M., Mohler, J.L. & French, F.S. (1997). Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol. Endocrinol.* **11**, 450-459
- Taplin, M.-E., Bubley, G.J., Schuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N. & Balk, S.P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1393-1398
- Thomas, A.P., Bird, G.S., Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L.D. & Putney, J.W.Jr. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* **10**, 1505-1517
- Tilley, W.D., Buchanan, G., Hickey, T.E. & Bentel, J.M. (1996). Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin. Cancer. Res.* **2**, 227-285
- Tilley, W.D., Marcelli, M., Wilson, J.D. & McPhaul, M.J. (1989). Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 327-331
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M. & Cantley, L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PI-3,4-P2 and PI-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.* **269**, 32358-32367
- Toullet, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D. & Kirilovsky, J. (1991). The bisindolylmaleimide GF109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 15771-15781
- Trachtenberg, J. & Walsh, P.C. (1982). Correlation of prostatic nuclear androgen receptor content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. *J. Urol.* **127**, 466471
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G.G.J.M., van der Korput, J.A.G.M., Faber, P.W., van Rooij, H.C.J., Guerts van Kessel, A., Voorhorst, M.M., Mulder, E. & Brinkmann, A.O. (1988). Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 241-248
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAPkinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 205-215
- Truss, M. & Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* **14**, 459-479
- Tsunoda, Y. (1993). Receptor-operated Ca²⁺ signaling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 105-156
- van der Kwast, T.H., Schalken, J., de Winter, J.A.R., van Vroonhoven, C.C.J., Mulder, E., Boersma, W. & Trapman, J. (1991). Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer. *Int. J. Cancer* **48**, 189-193

- Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Brinkmann, A.O., Grootegoed, J.A. & Mulder, E. (1992). Antiandrogens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat shock protein interactions, and transcriptional activation. *Biochemistry* **31**, 2393-2399
- Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G.J.M., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C.J., Trapman, J., Brinkmann, A.O. & Mulder, E. (1990). A mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor of LNCaP cells affects steroid-binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 534-540
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J. & Kallioniemi, O.P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genet.* **9**, 401-406
- 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
- Wade, P.A. & Wolffe, A.P. (1997). Chromatin: Histone acetyltransferases in control. *Curr. Biol.* **7**, R82-R84
- Wadewitz, A.G., Winer, M.A. & Wolgemuth, D.J. (1993). Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis. *Oncogene* **8**, 1055-1062
- Wainstein, M.A., He, F., Robinson, D., Kung, H.J., Schwartz, S., Giaconia, J.M., Edgehouse, N.L., Pretlow, T.P., Bodner, D.R. & Kursh, E.D. (1994). CWR22: Androgen-dependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **54**, 6049-6052
- Ward, S.G., June, C.H., & Olive, D. (1996). PI3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol. Today* **17**, 187-197
- Warner, C.L., Griffen, J.E., Wilson, J.D., Jacobs, L.D., Murray, K.R., Fischbeck, K.H., Dickoff, D. & Griggs, R.C. (1992). X-linked spino-muscular atrophy: a kindred with associated abnormal androgen binding. *Neurology* **42**, 2181-2184
- Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G. & Dorsa, D.M. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**, 4030-4033
- Webb, P., Lopez, G.M. Uht, R.M. & Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* **9**, 443-456
- Webster, N., Jin, J.R., Green, S., Hollis, M. & Chambon, P. (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the Gal4 transactivator. *Cell* **52**, 169-178
- Weinberg, R.A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* **49**, 3713-3721
- Westley, B. & Rochefort, H. (1980). Secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* **20**, 353-360.
- Wilson, J.D., Griffin, J.E. & Russell, D.W. (1993). Steroid 5-alpha reductase 2 deficiency. *Endocrine Rev.* **14**, 577-593

- Winer, M.A., Wadewitz, A.G. & Wolgemuth, D.J. (1993). Members of the raf gene family exhibit segment-specific patterns of expression in mouse epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 16-23
- Winer, M.A. & Wolgemuth, D.J. (1995). The segment-specific pattern of A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors. *Endocrinology* **136**, 2561-2572
- Wong, C.I., Kelce, W.R., Sar, M. & Wilson, E.M. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J. Biol. Chem.* **270**, 19998-20003
- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. & Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptor. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 87-94
- Yang, S.-H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. & Sharrocks, A.D. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 710-720
- Yang, X.-J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J.-I., Howard, B.H. & Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324
- Yeh, S. & Chang, C. (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA₇₀, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5517-5521
- Zhang, M., Magit, D. & Sager, R. (1997). Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive Ets element and a negative hormone responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5673-5678
- Zhou, Z.-x., Lane, M.V., Kempainen, J.A., French, F.S. & Wilson, E.M. (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol. Endocrinol.* **9**: 208-218
- Zhou, Z.-x., Sar, M., Simental, J.A., Lane M.V. & Wilson, E.M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 13115-13123
- Zinck, R., Hipkind, R.A. Pingoud, V. & Nordheim, A. (1993). c-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO J.* **12**, 2377-2387
- Zoppi, S., Marcelli, M., Deslypere, J.-P., Griffin, J.E., Wilson, J.D. & McPhaul, M.J. (1992). Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. *Mol. Endocrinol.* **6**, 409-415