



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5911B

**Molekulare Eigenschaften von
Progesteronantagonisten:
Steroidanaloga mit
spezifischer Wirkung**

H. Wehle
Institut für Genetik

Juni 1997

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5911 B

**Molekulare Eigenschaften von Progesteronantagonisten:
Steroidanaloga mit spezifischer Wirkung**

Horst Wehle

Institut für Genetik

**Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
genehmigte Dissertation**

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1997

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Antiprogestine aus der Gruppe der 11 β -aryl-substituierten 19-Norsteroiden sind geeignete Verbindungen, um die Einnistung der befruchteten Eizelle in die Uterusschleimhaut zu verhindern oder eine bestehende Schwangerschaft zu unterbrechen. Darüber hinaus sind die Substanzen nützlich bei der Behandlung von progesteronabhängigen Krankheiten, wie beispielsweise Meningeome, Endometriose oder zur Hemmung des Wachstums hormonabhängiger Karzinome. Jedoch sind diese Substanzen aufgrund ihrer starken Antiglucocorticoidwirkung bisher nicht für eine Langzeittherapie geeignet.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Transfektionsexperimente sowie Rezeptorbindungsstudien, *in vivo* footprint Analysen und Northern blot Experimente durchgeführt, um den Einfluß der Antiprogestine auf den Glucocorticoidrezeptor zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß alle Antiprogestine, mit Ausnahme der Substanzen ZK97397 und ZK98298, die durch den Glucocorticoidrezeptor vermittelten Wirkungen hemmen. Die schwachen antiglucocorticoiden Eigenschaften von ZK97397 und ZK98298 konnten in Experimenten bestätigt werden, in denen der Einfluß dieser Substanzen auf ein komplexes biologisches System wie die Glucocorticoid-induzierte Apoptose untersucht wurde.

Obwohl diese beiden Substanzen verringerte antiglucocorticoiden und keinerlei agonistische Eigenschaften besitzen, zeigen sie eine gewisse androgene Wirkung. Aus diesem Grund ist eine gegenwärtige therapeutische Anwendung noch bedenklich.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß der verschiedenen Antiprogestine auf die Repression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) durch Progesteron untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zur Repression der Collagenase-1 (MMP-1) durch Progesteron, die Expression von Matrilysin (MMP-7) durch ZK98299 induziert wird. In beiden Systemen sind die Progesteronantagonisten nicht in der Lage die Hormonwirkung zu hemmen. Im Falle des Matrilysins führen die beiden Antagonisten ZK98298 und ZK98299 gar zu einer Verstärkung der Genexpression in Anwesenheit von TPA und R5020. Der molekulare Mechanismus dieser erhöhten Genexpression konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

Darüber hinaus wurden mit Hilfe des "differential display" Versuche unternommen, weitere Gene zu identifizieren, deren Expression durch Antiprogestine reguliert wird. Die Kenntnis solcher Gene sowie ihrer Regulation trägt zum besseren Verständnis der tumorinhibierenden Eigenschaften von Antihormonen bei.

Abstract

Molecular effects of progesterone antagonists: Antihormones with specific activities

Antiprogestins of the 11β -aryl-substituted 19-norsteroid family are used effectively in inhibiting nidation and in terminating pregnancies. They are potentially useful in the treatment of progesterone-related diseases such as meningiomas and endometriosis and in inhibiting the growth of mammary tumors. However their long-term use is limited because of their inherent antiglucocorticoid activity.

In this work I have used distinct transfection experiments as well as receptor binding studies, *in vivo* footprint analyses and Northern blot experiments to investigate the ability of these antiprogestins to function through the glucocorticoid receptor. I have shown that all the antiprogestins inhibit the glucocorticoid response with two exceptions, ZK97397 and ZK98298. This weak antiglucocorticoid activity of ZK97397 and ZK98298 can also be observed in experiments in which these compounds were tested for their activity to inhibit glucocorticoid receptor induced apoptosis. The selected antiprogestins, although they show a reduced antagonist activity through the glucocorticoid receptor and virtually no agonist activity, possess some adrogenic effect. This therefore raises concerns on their future therapeutic uses.

In the second part of this work the effect of the antiprogestins on relieving negative regulatory activity of progesterone on matrix metalloproteinase (MMP) expression was analysed. Here I have shown that in contrast to collagenase-1 (MMP-1) which is negatively regulated by progesterone the expression of matrilysin (MMP-7) is enhanced by ZK98299. In both systems the antagonist do not overcome the action of the hormone. In the case of matrilysin some of the antagonists even enhanced better than the agonist. The molecular mechanism of this enhancement has not been examined.

Attempts have however been made by the method of "differential display" to isolate genes whose expression is regulated by the antiprogestins to enable a more thorough analysis of the regulatory mechanism of these antihormones.

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungen | V |
| Einleitung | 1 |
| 1. Steroidhormone | 1 |
| 1.1 Östrogene und Gestagene | 1 |
| 1.2 Struktur der Steroidhormonrezeptoren | 2 |
| 2. Funktion der Steroidhormonrezeptoren | 4 |
| 2.1 Negative Transkriptionskontrolle | 4 |
| 2.1.1 "Co-occupancy" | 5 |
| 2.1.2 "Tethering" | 6 |
| 2.1.3 "Squelching" | 6 |
| 3. Die therapeutische Anwendung von Steroidhormonen und Steroidhormonantagonisten | 7 |
| 4. Ziel der Arbeit | 8 |
| Material | 10 |
| 1. Material | 10 |
| 2. Radiochemikalien | 11 |
| 3. Bakterien und Zellen | 12 |
| 4. Plasmide | 12 |
| Methoden | 13 |
| 1. Allgemeine Arbeitsmethoden | 13 |
| 1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration | 13 |
| 1.2 Extraktion von Nukleinsäuren | 13 |
| 1.3 Fällung von Nukleinsäuren | 13 |
| 1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese | 14 |
| 1.4.1 Agarosegel | 14 |
| 1.4.2 Polyacrylamidgel | 14 |
| 1.4.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen | 14 |
| 1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten | 15 |
| 1.5.1 aus Agarosegelen | 15 |

II

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.2 | aus Polyacrylamidgelen | 15 |
| 1.6 | Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden | 15 |
| 1.6.1 | Kinasierung von Oligonukleotiden | 15 |
| 1.6.2 | Hybridisierungsproben, durch Einbau von [α - 32 P] dCTP | 16 |
| 1.7 | Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983) | 16 |
| 1.8 | Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien | 17 |
| 1.8.1 | Präparation im kleinen Maßstab | 17 |
| 1.8.2 | Präparation im großen Maßstab | 17 |
| 1.9 | Isolierung von Poly-A ⁺ -RNA aus Zellen | 18 |
| 1.10 | Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger <i>et al.</i> , 1977) | 18 |
| 2. | DNA-Klonierungstechniken | 19 |
| 2.1 | Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 19 |
| 2.2 | Ligation von DNA-Fragmenten | 20 |
| 3. | Zellkultur | 20 |
| 3.1 | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 20 |
| 3.2 | Trypsinbehandlung | 20 |
| 3.3 | Transfektionen | 21 |
| 3.3.1 | Transiente Transfektion | 21 |
| 3.3.2 | Stabile Transfektion | 21 |
| 4. | Analytische Methoden | 22 |
| 4.1 | Bestimmung der CAT-Aktivität (Gorman <i>et al.</i> , 1982) | 22 |
| 4.1.1 | Herstellung von Gesamtzellextrakten | 22 |
| 4.1.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry <i>et al.</i> , 1951) | 22 |
| 4.1.3 | CAT-Aktivitätsbestimmung | 22 |
| 4.2 | <i>In vivo</i> Dimethylsulfat-"footprint" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion (LMPCR) (Mueller und Wold, 1989) | 23 |
| 4.2.1 | <i>In vivo</i> Methylierung von DNA durch Dimethylsulfat (DMS) in lebenden Zellen und Präparation genomischer DNA | 23 |
| 4.2.2 | <i>In vitro</i> Methylierung genomischer DNA (Maxam und Gilbert, 1980) | 23 |
| 4.2.3 | Piperidinspaltung der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> methylierten genomischen DNA (Maxam und Gilbert, 1980) | 24 |
| 4.2.4 | Amplifikation und radioaktive Markierung der Piperidinspaltprodukte | 24 |
| 4.2.4.1 | Erststrangsynthese | 24 |
| 4.2.4.2 | Ligation des Linkers | 24 |

III

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.4.3 Die Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaktion" PCR) und radioaktive Markierung | 25 |
| 4.3 Differentielle Expression von mRNA-Spezies mittels DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction) (Liang und Pardee, 1992) | 26 |
| 4.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA (Chromczynski <i>et al.</i> , 1987) | 26 |
| 4.3.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription | 26 |
| 4.3.3 Amplifikation der cDNA mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) | 27 |
| 4.3.4 Isolierung, Reamplifikation und Klonierung der differentiell exprimierten Fragmente | 27 |
| 4.4 Northern blotting | 28 |
| Ergebnisse | 30 |
| 1. Struktur und Bezeichnung der Progesteron-Antagonisten | 31 |
| 2. Vergleich der antigestagenen und antiglucocorticoiden Wirkung der Antagonisten | 32 |
| 3. Konzentrationsabhängige Antigluocorticoidwirkung von ZK97397 und ZK98298 | 36 |
| 4. Die schwache antigluocorticoide Wirkung von ZK97397 und ZK98298 ist nicht ausschließlich einer reduzierten Affinität zum Glucocorticoidrezeptor zuzuschreiben | 38 |
| 5. Agonistische Wirkung der Hormonantagonisten ZK97397 und ZK98298 bezüglich des Glucocorticoidrezeptors | 40 |
| 5.1 <i>In vivo</i> Glucocorticoidrezeptor Bindungsstudien am Promotor des Tyrosinaminotransferase Gens | 40 |
| 5.2 Die Hormonantagonisten ZK97397 und ZK98298 besitzen keine agonistische Wirkung bezüglich des Glucocorticoidrezeptors | 46 |
| 5.2.1 Northern blot Analyse der Expression des Tyrosinaminotransferase Gens in FTO-Zellen | 46 |
| 5.2.2 Aktivierung des MMTV-Promotors durch Progesteronantagonisten | 47 |
| 5.2.3 Reduzierte antagonistische Wirkung von ZK97397 und ZK98298 gegenüber RU486 auf die Glucocorticoid-induzierte Apoptose | 49 |
| 5.3 Die agonistische Wirkung der Progesteronantagonisten ZK97397 und ZK98298 bezüglich des Androgenrezeptors | 52 |
| 6. Negativregulation von Genen durch Steroidhormonrezeptoren | 54 |

IV

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1 Regulation der Expression des menschlichen Collagenase 1-Promotors durch verschiedene Progesteronantagonisten | 54 |
| 6.2 Regulation von Matrixmetalloproteinasen durch Progesteronantagonisten <i>in vivo</i> | 58 |
| 6.3 <i>In vitro</i> System für die Regulation der Expression des Matrilysingens | 61 |
| 6.3.1 Nachweis der Expression des Matrilysingens in Zellkultur | 61 |
| 6.3.2 Wirkung verschiedener Hormonantagonisten auf den Matrilysin-promotor in EFE-184-Zellen | 63 |
| 7. Auf der Suche nach antihormonregulierten Genen | 66 |
| 7.1 Identifizierung eines hormonell induzierten Genfragments mittels "differential display" | 69 |
| 7.2 Nachweis der hormonabhängigen Regulation des differentiell exprimierten cDNA-Fragments mittels Northern blot Analyse | 70 |
| 7.3 Sequenzanalyse des Kones 30.1 | 72 |
| Diskussion | 75 |
| 1. Charakterisierung von Antiprogestinen mit verminderter Antigluocorticoidwirkung | 75 |
| 2. Einfluß von Antigestagenen auf die Regulation AP-1 abhängiger Gene am Beispiel einiger Matrixmetalloproteinasen | 78 |
| 3. Auf der Suche nach Antagonist-regulierten Genen mit Hilfe des Differential display | 81 |
| Literatur | 84 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(häufig verwendeter Abkürzungen)

| | |
|----------------|------------------------------------|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Ap | Ampicilin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| bidest. | zweifach destilliert |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | ungefähr |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CAT | Chloramphenicol-Acetyltransferase |
| D | Dalton |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-Triphosphat |
| DBD | DNA-Bindungsdomäne |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-Triphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat |
| Dex | Dexamethason |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-Triphosphat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMS | Dimethylsulfat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-Triphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiotreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-Triphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EBr | Ethidiumbromid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

VI

| | |
|----------|----------------------------------------------------|
| EtOH | Ethanol |
| g | Gramm, Fallbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HBD | Hormon -Bindungsdomäne |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 Ethansulfonsäure |
| HRE | hormone response element |
| HSP, Hsp | Hitzeschockprotein |
| IAA | Isoamylalkohol |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalakto-pyranosid |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasen |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kD | Kilo-Dalton |
| K-MES | K-Morpholin-Ethansulfonsäure |
| l | Liter |
| LB | Luria-broth |
| LBD | Liganden-Bindungsdomäne |
| Lsg | Lösung |
| LTR | long terminal repeat |
| M | molar, mol/l |
| m | milli, 10^{-3} |
| μ | mikro, 10^{-6} |
| mA | milli-Ampère |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute(n) |
| MMTV | Maus Mamma Tumor Virus |
| mRNA | messenger-RNA |
| NLS | nuclear localization sequence |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NBT | Nitroblau-Tetrazolium |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| n | nano, 10^{-9} |
| OD | optische Dichte |
| p.a. | pro analysis |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |

VII

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------|
| PEG | Polyethylenglycol |
| p | piko, 10^{-12} |
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| sec | Sekunde(n) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sog | sogenannt(e) |
| Tab. | Tabelle |
| TAF | Transaktivierungsfunktion |
| TBE | Tris/Borsäure/EDTA |
| TE | Tris/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tri-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| tRNA | transfer-RNA |
| T4 | <i>E. coli</i> -Phage T4 |
| U | Unit(s) (Einheit der Enzymaktivität) |
| ÜN | über Nacht |
| ÜNK | Übernachtkultur |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen/Volumen |
| vergl. | vergleiche |
| wt | Wildtyp |
| w/v | Gewicht/Volumen |

Die Aminosäuren sind mit dem international gebräuchlichen Dreibuchstaben-Code oder den Einbuchstaben-Symbolen abgekürzt.

Einleitung

1. Steroidhormone

Steroidhormone bilden eine Klasse nahe verwandter, lipophiler Substanzen, deren Grundstruktur auf das charakteristische Vierringsystem des Gonans zurückzuführen ist. Zu den Hauptgruppen dieser Hormone zählen die Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene sowie die weiblichen Geschlechtshormone, die Östrogene und das Progesteron. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit besitzen diese Verbindungen eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Wirkungen.

Frühere Untersuchungen (Horwitz, 1992) haben gezeigt, daß die weiblichen Geschlechtshormone u.a. bei der Entstehung von Brust- und Gebärmutterkrebs eine wichtige Rolle spielen. Das Zusammenspiel und die Wirkung dieser Hormone in der Brustdrüse und dem Endometrium während des Menstruationszyklus sowie die Hemmung ihrer Aktivität durch geeignete Steroidhormonantagonisten sollen im folgenden näher dargestellt werden.

1.1 Östrogene und Gestagene

Sexualhormone, wie beispielsweise Östrogene oder Gestagene (der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Progesteron), sind wichtige Regulatoren des Wachstums und der Entwicklung weiblicher Geschlechtsorgane (Greenspan und Baxter, 1993).

Syntheseort dieser Hormone ist das Ovar, in geringem Umfang die Nebennieren und während der Schwangerschaft auch die Plazenta. Im Verlauf des Menstruationszyklus spielen Östrogene und Progesteron eine außerordentlich wichtige Rolle bei den histologischen Veränderungen des Endometriums. In der Zyklusphase vor dem Eisprung steigt die Produktion an Östrogenen stark an. In diesem Zeitraum wächst die Schleimhaut, insbesondere das Drüsenepithel (Proliferationsphase). Nach dem Eisprung fällt der Östrogenspiegel allmählich wieder ab. Diese zweite Phase des Zyklus wird überwiegend dominiert durch das vom Gelbkörper (Corpus luteum) sezernierte Hormon, das Progesteron. In dieser sogenannten Sekretionsphase differenzieren die Zellen des endometrialen Drüsenepithels zu sekretorischem Gewebe (Longacre und Bartow, 1986). Am Ende des Zyklus fallen sowohl die Östrogen- als auch die Progesteronwerte ab, sofern keine Befruchtung der Eizelle stattgefunden hat, und es kommt zur Degeneration der Uterusschleimhaut (Desquamationsphase).

Kommt es hingegen zu einer Schwangerschaft, wird ein hoher Progesteronspiegel aufrecht erhalten. Entzug des Progesterons oder die Blockade des Progesteronrezeptors durch entsprechende Antagonisten führen zum Schwangerschaftsabbruch.

Beobachtet man im Verlauf der ersten Zyklusphase eine Proliferation des Endometriumepithels, kann man in der Brustdrüse während dieser Zeitspanne nur eine geringe DNA Synthese feststellen (Longacre und Bartow, 1986). Hingegen erreicht die Proliferation des Brustepithels seinen Höhepunkt einige Tage nach dem Eisprung, wenn sowohl Östrogene als auch Gestagene in hoher Konzentration vorhanden sind. Zu diesem Zeitpunkt ist die Proliferation des Endometriums bereits abgeschlossen (Longacre und Bartow, 1986). Das Proliferationsprofil sowie die Konzentration an Östrogen und Progesteron deuten darauf hin, daß Östrogene die Proliferation des Endometriums stimulieren, während Progesteron diesem Effekt entgegenwirkt (King, 1991). Im Falle der Brust scheinen sowohl Östrogene als auch Gestagene mitogene Wirkung zu besitzen (Henderson *et al.*, 1993). Die wachstumsstimulierende Wirkung des Progesterons auf das gesunde Brustepithel läßt vermuten, daß dieser Stimulus für das Wachstum von Brusttumoren mitverantwortlich ist. Auch Östrogene spielen sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Proliferation dieser Tumore eine zentrale Rolle (Henderson *et al.*, 1993).

1.2 Struktur der Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormone üben ihre Funktion dadurch aus, daß sie mit ihren jeweiligen Steroidhormonrezeptoren interagieren. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die im inaktiven Zustand entweder im Zytoplasma (z. B. der Glucocorticoidrezeptor (Picard und Yamamoto, 1987; Wilkström *et al.*, 1987)) oder im Zellkern (z.B. der Östrogenrezeptor (Gasc *et al.*, 1989; King und Greene, 1984; Perrot-Appinat *et al.*, 1985)) vorliegen.

Die Struktur der Steroidhormonrezeptoren läßt sich in verschiedene Domänen einteilen (s. Abb. 1). Am N-terminalen Ende befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, daran anschließend die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und schließlich die Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Dabei stellt die zentral gelegene DNA-Bindungsdomäne den am höchsten konservierten Bereich zwischen den verschiedenen Steroidhormonrezeptoren dar. Neun invariante Cysteinreste, innerhalb dieser Domäne, ermöglichen die Bildung zweier Zinkfinger, die für eine sequenzspezifische und stabile Bindung des Rezeptors an die DNA notwendig sind (Evans und Hollenberg, 1988; Freedman und Towers, 1991). Darüber hinaus sind bestimmte Bereiche der DBD (D-loop) an der Dimerisierung des Rezeptors nach der Aktivierung durch den Liganden beteiligt (Dahlman-Wright *et al.*, 1990; Dahlman-Wright *et al.*, 1991).

Die Liganden-Bindungsdomäne ist durch einen hydrophoben Bereich gekennzeichnet, welcher mit den jeweiligen Steroidhormonen interagiert (Carlstedt-Duke *et al.*, 1988; Strömstedt *et al.*, 1990). Neben der Bindung des Liganden ist diese Domäne entscheidend an der ligandenabhängigen Transaktivierung (Transaktivierungsfunktion 2, TAF-2), sowie

an der Dimerisierung zweier Rezeptormonomere beteiligt. In Abwesenheit des Liganden ist der Rezeptor in diesem Bereich mit verschiedenen Hitzeschockproteinen (HSP 70, HSP 90) assoziiert (Denis *et al.*, 1988; Housley *et al.*, 1990; Howard *et al.*, 1990). Dieser Rezeptorkomplex besitzt eine hohe Affinität zum Liganden (Bresnik *et al.*, 1989; Picard *et al.*, 1990; Ohara-Nemoto *et al.*, 1990). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Glucocorticoid- und Progesteronrezeptor im Bereich der LBD, sowie einer annähernd identischen Struktur der Liganden Cortisol und Progesteron sind diese Hormone *in vitro* in der Lage, in geringem Maße mit dem jeweils anderen Steroidhormonrezeptor zu interagieren. Die Interaktion von Antiprogestinen mit dem Glucocorticoidrezeptor ist weitaus stärker ausgeprägt, als dies für Progesteron der Fall ist.

Die Ligandenbindungsdomäne und die DNA-Bindungsdomäne sind durch ein variable "hinge" Region miteinander verbunden. In diesem Bereich befinden sich Sequenzen, die an der Translokation des Rezeptors in den Kern beteiligt sind (NLS: nuclear localization signal).

Die N-terminale Domäne der Steroidhormonrezeptoren ist sowohl in ihrer Länge als auch der Sequenz zwischen den verschiedenen Steroidhormonrezeptoren sehr variabel. Dieser Bereich enthält eine zweite Transaktivierungsfunktion (TAF-1).

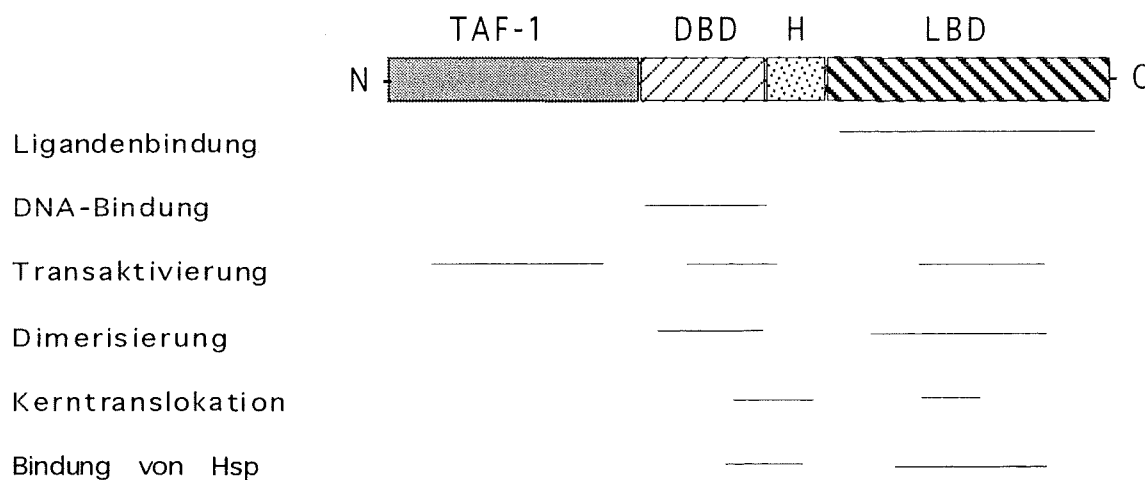


Abb. 1: Struktur und Funktion der Steroidhormonrezeptoren.

Die Struktur der Steroidhormonrezeptoren kann in verschiedene Domänen unterteilt werden: Beginnend am aminoterminalen Ende befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAF-1). Daran anschließend befindet sich der hoch konservierte Bereich der DNA-Bindedomäne (DBD) und die sogenannte "hinge" Region (H), mit dem 'nuclear localization signal'. Am carboxyterminalen Ende des Rezeptors befindet sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD). Neben der Bindung des Liganden ist dieser Bereich u.a. für die Dimerisierung zweier Monomere verantwortlich. Im inaktiven Zustand binden hier Hitzeschockproteine. (Verändert nach Saatcioglu *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zur TAF-2, im Bereich der HBD, ist sie jedoch auch in Abwesenheit des Liganden aktiv. Im aktiven Rezeptor interagieren beide Transaktivierungsfunktionen miteinander und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Aktivität (Saatcioglu *et al.*, 1993).

2. Funktion der Steroidhormonrezeptoren

Aufgrund ihres lipophilen Charakters können Steroidhormone durch freie Diffusion in ihre Zielzelle gelangen (Rao, 1981). In der Zelle binden die Steroidhormone mit hoher Affinität (K_D : 10^{-10} - 10^{-8} M) an ihre jeweiligen Steroidhormonrezeptoren (Yamamoto und Alberts, 1976).

Die Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden korreliert mit der Dissoziation der Hitzeschockproteine und führt zu einer Konformationsänderung (Mendel *et al.*, 1986; Sanchez *et al.*, 1990), zumindest im C-terminalen Bereich des Progesteronrezeptors (Allan *et al.*, 1992; Vegeto *et al.*, 1992). Gleichzeitig werden die Rezeptoren an mehreren Stellen phosphoryliert (Bagchi *et al.*, 1992; Denner *et al.*, 1990a,b; Orti *et al.*, 1989 und 1993; Bai und Weigel, 1996). Der Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Kern (Translokation), wo er als Dimer an spezifische Erkennungssequenzen der DNA bindet (Tsai *et al.*, 1988; Kumar und Chambon, 1988). Dabei handelt es sich um gegenläufige palindrome Hexanukleotidfolgen, die sich im Bereich von Promotoren oder Verstärkern (enhancer elements) von hormonabhängig regulierten Genen befinden. In einem komplexen Mechanismus, der im Moment noch nicht vollständig geklärt ist, wechselwirkt der aktivierte Rezeptor mit weiteren Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren oder direkt mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie und beeinflusst dadurch die Transkriptionsrate hormonabhängiger Gene (Giguere *et al.*, 1986; Hollenberg und Evans 1988; Ing *et al.*, 1992). Eine Schlüsselrolle bei der Transkription spielt der allgemeine Transkriptionsfaktor TFII-D, ein Multiproteinkomplex bestehend aus dem TATA-Bindungsprotein (TBP) und zusätzlichen Hilfsfaktoren (TAFs). TBP ist in der Lage, die basale Transkription von Promotoren zu stimulieren, die lediglich eine TATA-box besitzen. Für die Geninduktion durch Transkriptionsfaktoren, die an andere Regulationselemente binden, sind TAFs notwendig. Einer dieser Faktoren ist TAF_{II} 110. Im Falle des Progesteronrezeptors konnte eine direkte Wechselwirkung zwischen diesem Faktor und dem Rezeptor nachgewiesen werden (Schwerk *et al.*, 1995).

2.1 Negative Transkriptionskontrolle

Neben der Transaktivierung von Genen sind Steroidhormonrezeptoren auch an der negativen Regulation beteiligt und können, ligandenabhängig, die Repression bestimmter

Gene bewirken. Anders als bei der positiven Genregulation konnte für die Negativregulation noch kein allgemeines Modell formuliert werden. Gründe dafür sind vor allem darin zu suchen, daß bisher nur einige wenige negativ regulierte Gene untersucht wurden, und daß dabei unterschiedliche Mechanismen gefunden worden sind (Saatcioglu *et al.*, 1994; Drouin, 1993a; Miner *et al.*, 1991).

Eines der bestuntersuchten Beispiele für die Negativregulation von Genen ist die Interaktion zwischen Steroidhormonrezeptoren und den verschiedenen Faktoren der AP-1 Familie. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die sich aus je einem Mitglied der Fos- und Jun-Familie zusammensetzen (Angel und Karin, 1991). Einige Gene der Matrixmetalloproteinasen, z. B. Collagenase-1, sowie das Proliferin- und das Interleukin-2 Gen sind Beispiele für solche AP-1 regulierten Gene. Bei der Negativregulation der AP-1 Aktivität durch Steroidhormonrezeptoren wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie und dem untersuchten Gen verschiedene Mechanismen beschrieben. (Kamei *et al.*, 1996; Miner *et al.*, 1991; Saatcioglu *et al.*, 1994; Clark und Docherty, 1993; Pfahl, 1993; Hanna-Rose und Hansen, 1996). Dabei handelt es sich um "Co-occupancy", "Tethering" und "Squelching".

2.1.1 "Co-occupancy"

Beim "Co-occupancy" oder quenching kommt es dadurch zur Repression, daß unmittelbar benachbarte Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren gleichzeitig besetzt werden. Die Bindung beider Faktoren an die DNA führt zu direkten Protein-Protein-Interaktionen zwischen diesen beiden Faktoren, wodurch die Transaktivierung nachfolgender Gene gehemmt wird. Ein Beispiel für diese Art von Repression findet man beim Proliferin-Gen.

Im Promotor des Proliferin-Gens befindet sich je eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 und eine Bindestelle für den Glucocorticoidrezeptor in unmittelbarer Nachbarschaft nebeneinander (composite response element) (Diamond *et al.*, 1990; Mordaq und Linzer, 1989). Die Expression dieses Gens kann durch TPA induziert werden. Abhängig von der Zusammensetzung des AP-1 Komplexes (Jun/Jun oder Jun/Fos) und der Identität des Hormonrezeptors (z. B. GR oder Mineralocorticoidrezeptor) die an das 'composite element' binden, können die beiden Faktoren entweder kooperativ oder aber antagonistisch auf die Expression des Proliferin-Gens wirken (Lefstin *et al.*, 1994; Miner *et al.*, 1991).

2.1.2 "Tethering"

Beim "Tethering" kommt es zur Repression von Genen ohne direkte Bindung des Rezeptors an die DNA. Dabei interagiert der Rezeptor mit einem Aktivator, der seinerseits an Bindestellen der DNA gebunden ist. Die Bindung des Rezeptors reprimiert die Wirkung des Aktivators. Die Expression des Collagenase-1 Gens durch AP-1, sowie dessen Repression durch den Glucocorticoidrezeptor ist ein Beispiel für "Tethering".

Im Gegensatz zum "co-occupancy Modell" des Proliferin-Gens besitzt der Collagenase-Promotor lediglich eine Bindestelle für AP-1 aber keine Bindestelle für den Glucocorticoidrezeptor (Jonat *et al.*, 1990). Footprintanalysen haben gezeigt, daß die Repression der AP-1 Wirkung durch den Glucocorticoidrezeptor die Bindung von AP-1 an die DNA nicht beeinflußt (König *et al.*, 1992). Es ist daher anzunehmen, daß ausschließlich eine Protein-Protein Interaktion zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und DNA-gebundenem AP-1 zur Repression führt.

2.1.3 "Squelching"

Von "Squelching" wird dann gesprochen, wenn ein Repressor einen Aktivator durch direkte Protein-Protein Wechselwirkung daran hindert, an Erkennungsstellen auf der DNA zu binden. Dabei bindet keiner der beteiligten Faktoren an die DNA. Darüber hinaus ist denkbar, daß ein zur Aktivierung benötigter Cofaktor durch einen Repressor gebunden wird und dadurch nicht mehr für die Genaktivierung zur Verfügung steht.

Als Beispiel für einen solchen Cofaktor haben kürzlich Kamei und Mitarbeiter (1996) den Faktor CBP (CREB-binding protein) beschrieben. Dieser Faktor ist sowohl für die Aktivierung von AP-1 als auch von Steroidhormonen (Chakravarti *et al.*, 1996) notwendig. Möglicherweise ist für die Repression der AP-1 Aktivität durch den Glucocorticoidrezeptor eine Interaktion des Rezeptors mit CBP verantwortlich, wobei CBP durch den Glucocorticoidrezeptor gebunden wird und für eine Aktivierung von AP-1 nicht mehr zur Verfügung steht. Durch die Überexpression von CBP kann die hemmende Wirkung des Glucocorticoidrezeptors wieder aufgehoben werden.

Die Fähigkeit von Kernrezeptoren mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren deren Aktivität durch extrazelluläre Signale reguliert wird, wie beispielsweise AP-1 oder CREB, spielt eine wichtige Rolle beim Zusammenwirken von Steroiden auf der einen und Peptidhormonen und Cytokinen auf der anderen Seite. Diese Form der gemeinsamen Regulation ist an der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase beteiligt und ermöglicht die Feinabstimmung einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie z. B. Zellproliferation, Zelldifferenzierung

sowie Entzündungs- und Immunreaktionen (Wade *et al.*, 1995; Cato, 1994; Saatcioglu *et al.*, 1994).

3. Die therapeutische Anwendung von Steroidhormonen und Steroidhormonantagonisten

Sowohl die positive als auch die negative Wirkung von Steroidhormonen findet unter anderem auf der Ebene der Genregulation statt. Hierbei beeinflussen Steroidhormone in vielfältiger Weise die Physiologie und die Differenzierung von Zellen und Geweben. Sowohl ein Mangel als auch eine Überproduktion führen daher zu Dysfunktionen des Organismus. So führt beispielsweise ein erhöhter Glucocorticoidspiegel (z. B. ausgelöst durch eine Störung der Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Systems) zum Cushing-Syndrom (Trainer und Besser, 1991). Die Behandlung dieses Syndroms besteht in der operativen Entfernung des hypophysären Primärherdes oder aber durch die Gabe von Hormonantagonisten.

Hormonantagonisten werden eingesetzt, um die Wirkung endogener Hormone zu hemmen. Antagonisten sind synthetische Verbindungen, die mit dem natürlichen Liganden um die Bindung an den entsprechenden Hormonrezeptor konkurrieren. Solche Antagonisten wurden vor allem bei den Sexualhormonen entwickelt. Neben einer therapeutischen Anwendung bei verschiedenen sexualspezifischen Dysfunktionen (z. B. Pubertas praecox) liegt ihr Haupteinsatzgebiet heute in der Behandlung hormonabhängiger Tumore, insbesondere des Prostata- und Mammakarzinoms. Es ist lange bekannt, daß das Wachstum des Prostatakarzinoms durch Androgene, das des Mammakarzinoms durch Östrogene und Gestagene stimuliert wird. Antiandrogene wie das steroidale Cyproteronacetat oder das nichtsteroidale Flutamid werden daher erfolgreich zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingesetzt. Bei Brustkrebs ist das nichtsteroidale Antiöstrogen Tamoxifen seit langem das Mittel der Wahl. In klinischer Erprobung beim Mammakarzinom ist auch eine neue Klasse von Antihormonen, die Antigestagene (Klijn *et al.*, 1989). Die antiproliferativen Eigenschaften von Antigestagenen bei hormonabhängigen Brusttumoren konnte in verschiedenen Studien an Ratten, mit Dimethylbenzanthracen (DMBA)-induzierten Tumoren und an Mäusen, denen hormonabhängige MXT-Brusttumorzellen transplantiert wurden, gezeigt werden. Die Verabreichung von Progesteron während der DMBA-Behandlung fördert die Entstehung von Tumoren. Hingegen verzögert die Gabe des Progesteronantagonisten RU486 (Mifepriston) die Bildung von Tumoren. Bei bereits manifesten Tumoren ist RU486, analog zu Tamoxifen, in der Lage, das weitere Wachstum zu verhindern (Klijn *et al.*, 1989).

Neuere Antigestagene, z. B. ZK98299 (Onapriston) (Neef *et al.*, 1984) oder Org31710 (Kloosterboer *et al.*, 1994) die in ihrer Struktur gegenüber RU486 einige Modifikationen aufweisen, haben ähnliche oder stärkere antiproliferative Wirkung als RU486 (Michna *et al.*, 1992). Darüber hinaus besitzen sie, verglichen mit RU486, verringerte antiglucocoticoide und reduzierte androgene Eigenschaften (Wehle *et al.*, 1995; Kloosterboer *et al.*, 1994; Neef *et al.*, 1984).

Verbindungen wie Mifepriston oder Onapriston wirken nicht nur über einen klassischen Antagonismus, d. h. kompetitive Hemmung der Progesteronwirkung durch die Interaktion des Antagonisten mit dem Progesteronrezeptor, sondern sie induzieren möglicherweise eine terminale Differenzierung mitotisch aktiver Tumorzellen und bewirken dadurch eine Arretierung dieser Zellen in der G₀/G₁ Phase. Dieser Prozeß wird durch die Induktion oder Repression bestimmter Gene verursacht, wobei es in der Tumorzelle zu einem Reifungsprozess kommt, der letztendlich zum programmierten Zelltod, zur Apoptose, führt. Antiprogestine sind vermutlich in der Lage, die Regulation solcher Gene zu beeinflussen. Deshalb ist die Kenntnis solcher Gene von Bedeutung, um den Wirkungsmechanismus von Progesteron-antagonisten besser verstehen zu können (Schneider, 1993; Michna *et al.*, 1992).

Neueste Untersuchungen von Yang und Mitarbeitern (1996) haben gezeigt, daß das Antiöstrogen Raloxifen sowie Metaboliten von 17 β -Östradiol in der Lage sind, Gene zu induzieren, die keine Bindestellen für den Östrogenrezeptor besitzen. In diesem Fall interagiert der Antiöstrogen-induzierte Hormonrezeptor mit, bisher unbekanntem, Adaptorproteinen, die an sogenannte "raloxifene responsive elements" binden. Die Beobachtung, daß verschiedene Östrogenmetaboliten und einige Antiöstrogene verschiedene DNA-Bindestellen beeinflussen können, erklärt möglicherweise eine gewebsspezifische Wirkung dieser Substanzen (Yang *et al.*, 1996).

4. Ziel der Arbeit

Hormonantagonisten gewinnen bei der Behandlung hormonabhängiger Tumore sowie im Bereich der Schwangerschaftskontrolle zunehmend an Bedeutung. Für den Östrogenrezeptor wurden bereits wirksame und selektive Verbindungen entwickelt. Im Bereich der Antiprogestine hat man wirksame Substanzen gefunden, welche z. T. beträchtliche Nebenwirkungen aufweisen, so beispielsweise Übelkeit, Schwindelgefühl, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust (Klijn *et al.*, 1994). Diese Symptome werden vor allem durch Interaktion dieser Substanzen mit dem Glucocorticoidrezeptor ausgelöst.

Deshalb sollte im ersten Teil der Arbeit mit Hilfe verschiedener Systeme eine mögliche agonistische oder antagonistische Wirkung der Progesteronantagonisten durch den Glucocorticoidrezeptor sowie die Affinität dieser Verbindungen zum GR als auch eine mögliche Antagonist-induzierte Bindung des GR an die DNA untersucht werden. Desweiteren sollte eine mögliche reprimierende Wirkung dieser Antagonisten durch den Progesteronrezeptor in Zellkultur näher untersucht werden. Ziel war es, Substanzen zu identifizieren und zu charakterisieren, die eine starke antigestagene aber eine geringe antiglucocorticoide Wirkung besitzen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Identifizierung Antagonist-regulierter Gene, welche gegebenenfalls zur Differenzierung von Tumorzellen führen. Die Methode des "differential display" stellt ein geeignetes System dar, um sowohl Antagonist-induzierte als auch -reprimierte Gene zu identifizieren.

Material und Methoden

1. Material

Bezugsquellen

| | |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30/0,8) | Roth (Karlsruhe) |
| Agarose (SeaKem LE) | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Ammoniumperoxodisulfat | BioRad (München) |
| Ampicillin | Boehringer (Mannheim) |
| Aprotinin | Boehringer (Mannheim) |
| Bacto Agar | Difco (Detroit, MI, USA) |
| Bacto Hefeextrakt | Difco (Detroit, MI, USA) |
| Bacto Trypton | Difco (Detroit, MI, USA) |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat | Sigma (Deisenhofen) |
| Bromphenolblau | Serva (Heidelberg) |
| Coomassie Brilliant Blau R250 | Serva (Heidelberg) |
| 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate | Boehringer (Mannheim) |
| N,N'-Dimethylformamid | Sigma (Deisenhofen) |
| Dithiothreitol | Boehringer (Mannheim) |
| DMEM (synthetisches Kulturmedium) | Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) |
| Ethidiumbromid | Sigma (Deisenhofen) |
| Ficoll Typ 400 | Pharmacia (Freiburg) |
| Fötale Kälberserum | Bio Whittaker (Verviers, Belgien) |
| Genitacin-Sulfat (G418) | Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) |
| Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid | Roth (Karlsruhe) |
| L-Glutamin | Sigma (Deisenhofen) |
| 2-Mercaptoethanol (50 mM, für die Zellkultur) | Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) |
| 3MM Whatman Papier | Whatman (Maidstone, UK) |
| N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure | Roth(Karlsruhe) |
| 4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid | Sigma (Deisenhofen) |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin | BioRad (München) |
| Nonidet P40 | Boehringer (Mannheim) |
| Nukleosid-5'-Triphosphate | Boehringer (Mannheim) |
| Phenylmethylsulfonyl-Fluorid | Sigma (Deisenhofen) |
| Ribonuklease A | Sigma (Deisenhofen) |

| | |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|
| RPMI 1640 (synthetisches Kulturmedium) | Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) |
| Trypanblau | Serva (Heidelberg) |
| Trypsin | Difco (Detroit, MI, USA) |
| tRNA (aus Hefe) | Sigma (Deisenhofen) |
| Tween 20 | Serva (Heidelberg) |
| Xylencyanol FF | Serva (Heidelberg) |

Alle übrigen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2. Radiochemikalien

D-Treo (dichloracetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7.4 Mbq/ml)

γ -³²P-ATP (10 mCi/ml; >5000 Ci/mmol)

α -³²P-CTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham, Braunschweig bezogen.

3. Bakterien und Zellen

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli DH5α</i> | F ⁻ , L ⁻ , recA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁻), supE44, thi-1, gyrA96, relA1 |
| CV-1 | Affennierenzellen, Fibroblasten |
| EFE-184 | humane endometriale Karzinomzellen; entsprechend der EFE-184-Zellen (Acc230) der DSM Collection, Braunschweig |
| HeLa | humane Epitheltumorzelllinie aus einem Karzinom der Gebärmutter |
| HTC | epitheliale Rattenleberzellen |
| Ichikawa | humane T-Zelllinie (Kitahara <i>et al.</i> , 1978) |

| | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KLE | Humane endometriale Adenokarzinomzellen; entsprechend den KLE-Zellen (CRL 1622) der American Type Culture Collection |
| NIH 3T3 | Embryonale Mausfibroblasten; entsprechend den 3T3-Zellen der American Type Culture Collection. |
| T47D | humane Mammakarzinomzellen |

4. Plasmide

| | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pHCwt | MMTV LTR von Position -235 bis +125 bp vor dem CAT-Gen (Cato und Weinmann, 1988) |
| phAR | menschlicher Androgenrezeptor (Kaspar <i>et al.</i> , 1993) |
| ARE ₂ TATA CAT | Zwei Bindestellen für den Androgenrezeptor vor dem CAT-Gen (Kaspar <i>et al.</i> , 1993) |
| pRhGR | menschlicher Glucocorticoidrezeptor (Hollenberg <i>et al.</i> , 1987) |
| hPR _B | menschlicher Progesteronrezeptor (B-Form) in PSG5-Expressionsvektor (Kastner <i>et al.</i> , 1990) |
| p-933HPCAT | Promotor des humanen Matrilysingens von der Position -933 bis +35 bp vor dem CAT-Gen (Gaire <i>et al.</i> , 1994) |

Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Arbeitsprotokolle der Methodensammlung von Sambrook *et al.*, (1989) und Ausubel *et al.*, (1991) entnommen.

1. Allgemeine Arbeitsmethoden

1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messen ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA oder 20µg/ml Oligonukleotide. Die OD bei 280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen, da die aromatischen Aminosäuren in diesem Wellenlängenbereich die Strahlung absorbieren. Dabei sollte das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei doppelsträngiger DNA 1,8 und bei RNA 2 betragen.

1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde zu einem Volumen nukleinsäurehaltiger Lösung das gleiche Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) gegeben, kräftig gemischt und kurz zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.

1.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,2 M gebracht und mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Präzipitat wurde nach 30 minütiger Inkubation bei -20°C für 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet.

1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

1.4.1 Agarosegel

0,8-2 % Agarose Typ II wurde in 50 ml 0,5 x TBE (45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 1,25 mM EDTA, pH 8,3) durch Kochen geschmolzen und nach Zugabe von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid in eine horizontale Elektrophoresekammer (7,5 x 13,5 cm) gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Die DNA-Proben wurden mit 1 x Probenpuffer (10 mM EDTA, pH 8,0; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen. Das Gel wurde mit Laufpuffer (0,5 x TBE) überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 30-40 mA und 50-150 V. Die Fragmente wurden über einem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

1.4.2 Polyacrylamidgel

6-10 %-ige Polyacrylamidgele wurden aus einer Stammlösung mit 30 Gewichts-% Acrylamid und 0,8 Gewichts-% N,N'-Methylenbisacrylamid und 0,5 x TBE hergestellt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 1 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,1 % N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) zwischen zwei durch 2 mm breite Abstandhalter getrennte Glasplatten (14 x 15 cm). Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1 x Probenpuffer (10 mM EDTA, pH 8,0; 10 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte für ca. 1,5 h bei 150 V. Nach der Auftrennung der Proben wurden die Gele für 10 min in einer wäßrigen EtBr-Lösung (1 µg/ml) gefärbt, die DNA-Fragmente auf einem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

1.4.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen

Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 3 µl Sanger-Probenpuffer (98 % deionisiertes Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Xylencyanol; 0,03 % Bromphenolblau) gelöst, 5 min bei 85°C inkubiert, in Eis abgekühlt und sofort auf ein Gel aufgetragen. Das Gel bestand aus 6 % Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8) und 8 M Harnstoff in 90 mM Tris-HCl, pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA. 30 ml dieser Lösung wurden mit 0,1 % TEMED und 0,1 % APS zwischen zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit 0,15 mm dicken Abstandhaltern polymerisiert. Der Vorlauf des Gels erfolgte für 30 min bei 1500 V. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und zwischen 1,5 und 4 h bei 1500 V gelelektrophoretisch

aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte abgehoben und das Gel auf ein Whatman Filterpapier aufgezogen. Das Gel wurde auf dem Filter mit einem Vacuumtrockner getrocknet und schließlich auf einem Amersham Hyperfilm MP ÜN exponiert.

1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

1.5.1 aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von UV-Strahlung sichtbar gemacht. Mit einem Skalpell wurde unmittelbar nach der zu eluierenden Bande ein Schnitt gesetzt. In diesen Schnitt wurde ein passendes Stück DEAE-Membran eingesetzt und die Elektrophorese so lange fortgesetzt, bis die DNA-Bande vollständig in die Membran eingedrungen ist. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 65°C in 500 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 M NaCl) inkubiert und so die DNA von der Membran eluiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA in Ethanol gefällt.

1.5.2 aus Polyacrylamidgelen

Unter UV-Strahlung wurde die DNA sichtbar gemacht und das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde zerkleinert und die DNA ÜN bei 50°C in 0,2 M NaCl in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA-haltige Lösung wurde durch Zentrifugation über eine Quarzsandschicht von den Gelstücken abgetrennt und die DNA in Ethanol gefällt.

1.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

1.6.1 Kinasierung von Oligonukleotiden

20 ng Oligonukleotid wurde mit 30 µCi γ -³²P-ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur radioaktiven Markierung von Primern für *in vivo* "Footprint"-Analysen wurde 20 pmol einzelsträngiges Oligonukleotid mit 150 mCi γ -³²P-ATP und 20 U T4-Polynukleotidkinase in 30 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA für 1 h bei 37°C inkubiert.

Das markierte Oligonukleotid wurde über eine NACS Prepac Säule von den nicht eingebauten Radionukleotiden getrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurde die Säule mit 1 ml 1 M NaCl in TE (Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) äquilibriert und anschließend 4 x mit 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen. Die Probe wurde auf die Säule geladen. Nach dem Durchtropfen wurde die Säule 4 x mit 1 ml 0,1 M NaCl in TE gewaschen, das markierte Oligonukleotid mit 3 x 100 µl 1M NaCl in TE eluiert und nach Zugabe von 10 µg tRNA in Ethanol präzipitiert.

1.6.2 Hybridisierungsproben, durch Einbau von [α - 32 P] dCTP

Zur Herstellung von Hybridisierungsproben wurde das käuflich erworbene System der Firma Stratagene (Prime-It™ random primer labeling kit) verwendet. Die Reaktionen wurden gemäß der Herstellerangaben unter Verwendung von 20 bis 100 ng DNA und 3 µl [α - 32 P] dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) durchgeführt. Die Syntheseprodukte der Markierungsreaktionen wurden durch eine Säulenzentrifugation über eine Sephadex G50 Säule (äquilibriert in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA)) von den nicht-eingebauten [α - 32 P] dCTP abgetrennt. Das Eluat wurde direkt zu der Hybridisierung verwendet.

1.7 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983)

100 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto-Hefe Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur *E. coli* Bakterien (DH5 α) inokuliert und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Die Kultur wurde 10 min in Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C mit 2000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 20 ml Standardtransformationspuffer (STB: 100 mM KCl; 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 3 mM HA CoCl₃; 0,5 M K-MES, pH 6,3; 15 % Glycerol) resuspendiert und 15-20 min in Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut 10 min bei 4°C mit 2000 x g zentrifugiert und auf Eis vorsichtig in 4 ml STB resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und in flüssigem N₂ eingefroren oder sofort zur Transformation verwendet.

Zu 200 µl kompetenter Bakterien wurden 2 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 30-60 min in Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 3 ml SOC-Medium (SOC = SOB + 20 mM Glucose) wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und

anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf ampicillinhaltige Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C im Brutschrank.

1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

1.8.1 Präparation im kleinen Maßstab

1 ml einer ÜN-Kultur wurde 10 min bei 5000 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Lösung A (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 2,5 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl Lösung B (0,2 M NaOH; 1 % SDS) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurden 150 µl Lösung C (3 M Na-Acetat) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Inkubation für 15 min in Eis wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA 10 min bei 4°C mit 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ethanol für 5 min in Trockeneis gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Pellet in 200 µl Lösung D (0,1 M Na-Acetat; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und erneut mit 500 µl Ethanol präzipitiert. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Präzipitat wurde in 40 µl H₂O aufgenommen und jeweils 10 µl für einen Restriktionsverdau verwendet.

1.8.2 Präparation im großen Maßstab

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Säulenreinigung mit Quiagen-tips 500. Dazu wurden 200 ml rekombinante Bakterien ÜN bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wurde 5 min bei 5000 x g zentrifugiert, das Bakterien-Pellet in 10 ml Puffer 1 (100 µg/ml RNase A; 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM EDTA) resuspendiert und 15 min in Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Puffer 3 (2,55 M KAc, pH 4,8) wurde die Suspension kurz gemischt und sofort für 30 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Quiagen-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 0,15 % Ethanol; 0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde zum Durchtropfen auf die Säule geladen, dabei bindet die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1,0 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Ethanol) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8,2; 15 % Ethanol) von der Säule eluiert, mit 10,5 ml 2-Propanol gefällt und sofort für 30 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol

gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 300 μl H_2O resuspendiert und die Konzentration im Photometer bestimmt.

1.9 Isolierung von Poly-A⁺-RNA aus Zellen

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 0,7 mM CaCl_2 ; 3 mM KCl; 0,6 mM MgCl_2) zweimal gewaschen und in 10 ml STE (100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K) durch Abschaben geerntet. Die genomische DNA der Zellen wurde 30 sec mit einem Ultra Turrax geschert. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei 37°C inkubiert, mit 5 M NaCl-Lösung eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl in der Suspension eingestellt, 100 mg Oligo-dT-Zellulose in HSB (300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,1% SDS) zugegeben und ÜN unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert. Dann wurde die Oligo-dT-Zellulose durch Zentrifugation (1000 x g, 20°C, 2 min) pelletiert, der Überstand abgenommen und die Oligo-dT-Zellulose fünfmal mit HSB gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Elution der, an die Oligo-dT-Zellulose gebundenen, RNA durchgeführt. Dazu wurde die pelletierte Oligo-dT-Zellulose viermal in je 1 ml H_2O eluiert, erneut pelletiert und anschließend jeweils 950 μl des Überstandes abgenommen und gesammelt. Um eventuell in dem Eluat noch vorhandene Oligo-dT-Zellulose zu entfernen, wurde das Eluat mit 2000 x g, bei 4°C, 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Von dem Überstand wurden 300 μl zur spektralphotometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen. Der verbleibende Überstand wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,8 auf eine Konzentration von 0,2 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20°C. Anschließend wurde die RNA bei 10000 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert, das Pellet im Vakuum getrocknet und in H_2O resuspendiert.

1.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierungsreaktion wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit einem Sequenase-Kit (United Biochemical Cooperation) durchgeführt. 3 μg DNA wurden bei RT für 5 min in 20 μl 0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA denaturiert, anschließend mit 2 μl 2 M NH_4 -Acetat, pH 4,6 neutralisiert und bei -80°C mit Ethanol gefällt. Nach 5 min wurde die DNA für 10 min bei 7000 x g zentrifugiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 μl H_2O resuspendiert. Zur Hybridisierung des Primers wurden 7 μl DNA-Lösung mit 2 μl 5 x Sequenase-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl_2 ; 250 mM NaCl)

und 1 μl Primer (1 pmol/ μl) gemischt und für 3 min auf 65°C erhitzt. Das Abkühlen erfolgte langsam bei RT für ca. 30 min. Während dessen wurden 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 2,5 μl der entsprechenden Terminationsmischungen (dideoxy (dd)GTP; ddATP; ddTTP; ddCTP)* vorbereitet und auf 37°C vorgewärmt. Für die Markierungsreaktion wurden zu den 10 μl Hybridisierungslösung 1 μl 0,1 M DTT; 2 μl 1:5 verdünnte Markierungsmischung (Endkonzentration: 1,5 μM dGTP; 1,5 μM dCTP; 1,5 μM dTTP); 1 μl ^{35}S -dATP (Amersham, 8 μCi , 660 Ci/mmol) und 2 μl 1:8 mit TE verdünnte Sequenase gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Zur Termination der Reaktion wurden jeweils 3,5 μl der Markierungsreaktion in die 4 vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 μl Sanger Probenpuffer (98 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylenxanol) wurden die Proben für 3 min bei 90°C denaturiert und nach Abschrecken in Eiswasser auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel bei 1500 V in 1 x TBE aufgetrennt (siehe 1.4.3). Die Autoradiographie erfolgte mit einem Amersham Hyperfilm MP und mit einer Verstärkerfolie.

*Die Terminations-Mischungen enthalten:

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

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

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

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

2. DNA-Klonierungstechniken

2.1 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit (U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als diejenige Menge Enzym, welche benötigt wird, um 1 μg DNA des Phagen Lambda in einer Stunde zu verdauen. In der Regel wurde ein 2-3 facher Überschuß an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Für den jeweiligen Restriktionsverdau wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten.

2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 zusammengegeben und mit 1 U T4 DNA-Ligase in 30 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,1 mg/ml BSA und 1 mM ATP für 12 h bei 15°C inkubiert.

3. Zellkultur

Die CV 1-, COS 7-, HTC-, Ishikawa- und NIH 3T3-Zellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 6 % CO₂ kultiviert. EFE-184-, T47D- und KLE-Zellen wurden in RPMI 1640 ebenfalls mit 10 % FCS und 10 µg/ml Insulin bei 37°C und 6 % CO₂ kultiviert. FTO-Zellen wurden in DMEM/F12 (1:1) Medium und 10 % FCS kultiviert. Stabil transfizierte Zellen (siehe 3.3.2) wurden in DMEM + 10% FCS + 0,3 mg/ml G418 kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, und die Zellen wurden bei Erreichen von 80 % Konfluenz trypsinisiert (siehe 3.2) und zur weiteren Kultivierung 1:5 verdünnt.

3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsinisiert, bei 500 x g zentrifugiert und in Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen (5×10^6 Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde 30 min in Eis inkubiert, dann in einem Styroporbehälter 12-14 h bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Im Wasserbad, das eine Temperatur von 37°C hatte, wurden die Zellen rasch aufgetaut. Die Zellen wurden bei 500 x g pelletiert, der Überstand abgenommen, in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

3.2 Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml 0,05% Trypsin pro 10 cm-PS für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, gezählt und in gewünschter Dichte ausgesät.

3.3 Transfektionen

Es wurde eine modifizierte Form der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (Graham und van der Eb, 1973) durchgeführt.

3.3.1 Transiente Transfektion

Am Vortag wurden 8×10^5 Zellen pro 10 cm-PS ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Das Präzipitat, das für die Transfektion einer Schale von Zellen benötigt wurde, wurde wie folgt angesetzt: die DNA wurde in insgesamt 250 μ l H_2O gegeben, dann wurden 250 μ l 2 x HBS (50 mM Hepes; 280 mM NaCl; 1,6 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, pH 7.05) untergemischt und schließlich tropfenweise 25 μ l 2,5 M $CaCl_2$ -Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 4-6 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgenommen, 4 ml Glycerollösung (15 % Glycerol in PBS) zugegeben, nach 2 min wieder abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (137 mM NaCl; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 0,7 mM $CaCl_2$; 3 mM KCl; 0,6 mM $MgCl_2$) gewaschen und schließlich frisches Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden nach 36 h geerntet, um die Enzymtests (CAT-Aktivitätstest und β -Galaktosidasetest) durchzuführen.

3.3.2 Stabile Transfektion

Am Vortag der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät, am Tag der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch DMEM, versetzt mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin, ersetzt. Das Präzipitat wurde wie folgt angesetzt: 13 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA, 1 μ g des Plasmids pSV2neo; 10 μ g zerkleinerte Lachssperma-DNA und 120 μ l 2 M $CaCl_2$ -Lösung wurden mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l ergänzt, diese Lösung wurde dann zu 500 μ l 2 x HBS (50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,6 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, pH 7.05) zugetropft, 30 min bei RT inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS (137 mM NaCl; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 0,7 mM $CaCl_2$; 3 mM KCl; 0,6 mM $MgCl_2$) gewaschen und das für die jeweilige Zelllinie verwendete Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen trypsinisiert und auf 3 neue Zellkulturschalen verteilt. Nun wurde Kulturmedium verwendet, dem zusätzlich das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 200 μ g/ml zugesetzt worden war.

Nach 10-14 Tagen wurden die Zellkulturschalen auf das Vorhandensein von Klonen überprüft.

4. Analytische Methoden

4.1 Bestimmung der CAT-Aktivität (CAT-Assay) (Gorman *et al.*, 1982)

4.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Ernte der transfizierten Zellen wurde das Medium von den Gewebekulturschalen abgenommen, die Zellen zweimal mit ca. 10 ml kaltem PBS (137 mM NaCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 0,7 mM CaCl₂; 3 mM KCl; 0,6 mM MgCl₂) gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 x g zentrifugiert und in 100 µl 250 mM Tris-HCl, pH 7,6 resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren (Ethanol/Trockeneisbad) und Auftauen bei 37°C (Wasserbad) aufgebrochen. Die Zellfragmente wurden 10 min bei 5000 x g pelletiert und der proteinhaltige Überstand bei -20°C aufbewahrt.

4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry *et al.*, 1951)

10 µl Gesamtzellextrakt wurden mit 490 µl Lowry-Lösung I (2 % Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH) gemischt und anschließend 1 ml Lösung IV (frisch gemischt aus: 500 µl 2 % NaK-Tartrat (Lösung II); 50 µl Lösung I; 500 µl CuSO₄ (Lösung III)) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl frisch angesetzte 50 % Folin-Lösung zugegeben, gut gemischt und 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

4.1.3 CAT-Aktivitätsbestimmung

Jeweils gleiche Proteinmengen wurden mit 2 µl ¹⁴C-Chloramphenicol und 20 µl 4 mM Acetyl-Coenzym A in 100 µl 250 mM Tris-HCl, pH 7,6 für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Chloramphenicol mit 750 µl Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert und in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Rückstand wurde in 15 µl Ethylacetat aufgenommen und punktförmig auf eine 20x20 cm große Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung des nicht umgesetzten Chloramphenicols und der acetylierten Formen erfolgte mit einem

Chloroform/Methanol Gemisch (9:1) als Laufmittel. Nach dem Trocknen der Dünnschichtchromatographie Platte an der Luft erfolgte die Autoradiographie bei RT ÜN. Zur Bestimmung der umgesetzten Mengen an Chloramphenicol wurde die Dünnschichtchromatographieplatte mit Hilfe eines Phosphoimagers der Firma Fuji ausgewertet. Da die Enzymaktivität proportional dem umgesetzten Substrat ist, erfolgt die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität in $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

4.2 *In vivo* Dimethylsulfat-"footprint" durch ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion (LMPCR) (Mueller und Wold, 1989)

4.2.1 *In vivo* Methylierung von DNA durch Dimethylsulfat (DMS) in lebenden Zellen und Präparation genomischer DNA

Die Zellen einer 15 cm Gewebekulturschale wurden einmal mit 37°C warmem PBS gewaschen und bei RT für 2 min mit 5 ml 0,5 % DMS in DMEM/ 10 mM HEPES-KOH, pH 7,5 inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 5 ml PBS abgeschabt und bei 4°C und 500 x g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,7; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % SDS) resuspendiert und nach Zugabe von 300 µg/ml Proteinase K bei 37°C ÜN inkubiert. Das Lysat wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 1.2) und in Anwesenheit von 0,25 M Na-Acetat mit 2-Propanol gefällt. Die genomische DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µg RNase A und Inkubation für 30 min bei RT wurde erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die genomische DNA gefällt.

4.2.2 *In vitro* Methylierung genomischer DNA (Maxam und Gilbert, 1980)

Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben, die Zellen blieben jedoch unbehandelt. Die gefällte DNA wurde in 200 µl Cacodylat-Puffer (50 mM Na-Cacodylat; 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und mit 1 µl DMS für 20 sec bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl DMS-Stopplösung (1,5 mM Na-Acetat, pH 7,0; 1 M 2-Mercaptoethanol; 100 µg/ml tRNA) beendet und die DNA mit 750 µl Ethanol gefällt. Die DNA wurde in 250 µl 0,3 M Na-Acetat aufgenommen und erneut mit Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.2.3 Piperidinspaltung der *in vivo* und *in vitro* methylierten genomischen DNA (Maxam und Gilbert, 1980)

Die getrocknete DNA wurde in 100 µl 10 %-igem Piperidin resuspendiert und für 30 min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben in Eis, wurden 200 µl 0,3 M Na-Acetat zugegeben und die DNA mit 900 µl Ethanol gefällt. Anschließend wurde die DNA zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 44 µl H₂O resuspendiert und die Konzentration bestimmt (siehe 1.1).

4.2.4 Amplifikation und radioaktive Markierung der Piperidinspaltprodukte

4.2.4.1 Erststrangsynthese

Jeweils 3 µg, durch Piperidin gespaltene genomische DNA, wurde mit 0,6 pmol Primer 1 in 15 µl 40 mM Tris-HCl, pH 7,7 und 50 mM NaCl für 3 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden danach sofort zur Hybridisierung des Primers für 30 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 9,5 µl Sequenase-Mischung (7,5 µl 20 mM MgCl₂/20 mM DTT; 1 µl 480 µM dNTPs; 1 µl 1 x TE; 0,346 µl Sequenase (13 U/µl)) zugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei 45°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abschrecken der Proben in Eis gestoppt. Durch Zugabe von 6 µl 310 mM Tris-HCl, pH 7,7 und Erhitzen der Proben für 15 min bei 67°C wurde die Sequenase inaktiviert.

4.2.4.2 Ligation des Linkers

Der Linker wurde durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide hergestellt: 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGTGAATTC-3' (langes Linker-Oligonukleotid) und 5'-GAATTCAGATC-3' (kurzes Linker-Oligonukleotid). Für die Technik ist es wichtig, daß der Linker keine 5'-Phosphate besitzt und auf einer Seite überhängende Enden aufweist, um die Selbstligation zu vermeiden. Die beiden Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl in 250 mM Tris-HCl, pH 7,7 zu gleichen Mengen zusammengegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die DNA-Lösung wurde im Eppendorfreaktionsgefäß in ein Becherglas mit 100 ml 70°C heißen Wassers überführt und langsam auf RT abgekühlt.

Für die Ligation des Linkers wurden die Proben aus der Erststrangsynthese in Eis inkubiert und jeweils 20 µl Verdünnungspuffer (17,5 mM MgCl₂; 42,3 mM DTT; 126 µg/ml BSA) zugegeben. Anschließend wurden 25 µl Ligationsmischung, bestehend aus: 20 µl Ligationspuffer (10 mM MgCl₂; 20 mM DTT; 3 mM ATP; 50 µg/µl BSA), 5 µl Linker (20 pmol/µl) 3 U T4-DNA-Ligase, zugegeben und die Reaktion für 4-16 h bei 15°C

inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 70°C für 10 min gestoppt. Die DNA wurde anschließend in Gegenwart von 10 µg tRNA mit Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.2.4.3 Die Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaktion", PCR) und radioaktive Markierung

Die gefällte DNA wurde in 59 µl H₂O gelöst und anschließend 20 µl 5 x Taq-Puffer (200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 25 mM MgCl₂; 0,05 % Gelatine), 5 µl Primer 2 (2 pmol/µl) und 5 µl des langen Linker-Oligonukleotids (2 pmol/µl) zugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gemischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und danach sofort in Eiswasser abgeschreckt. Nach Zugabe von 10 µl einer 2,5 mM dNTP-Mischung und 4 µl einer 1:4 in 1 x Taq-Puffer verdünnten Taq-Polymerase (AmpliTaq™, Cetus-Perkin-Elmer Corporation, 5 U/µl) wurden die Probe gemischt, in spezielle 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die PCR Reaktion in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Es wurden 20 Zyklen mit folgenden Werten programmiert:

1 min Denaturierung bei 95°C

2 min Hybridisierung der Primer bei 68°C

3 min Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase bei 72°C.

Die Proben wurden in Eis abgekühlt und jeweils 2 pmol ³²P-endmarkierter Primer 3 (ca. 2-5 x 10⁶ cpm), 2,5 U Taq-Polymerase und 2 µl 1 mM dNTP-Mischung zugegeben. Die Proben wurden erneut für einen Zyklus in den Thermocycler transferiert und dort 2 min bei 95°C, 2 min bei 68°C und 10 min bei 72°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 295 µl Stop-Lösung (260 mM Na-Acetat; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 4 mM EDTA) in Eis gestoppt. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die Proben mit Ethanol gefällt und zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Die getrockneten Proben wurden in 6 µl Sanger-Probenpuffer (80 % deionisiertes Formamid; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylenxyanol) aufgenommen und davon 2 µl auf ein 6 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 3 h bei 1500 V.

4.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA (Chromczynski *et al.*, 1987)

Die Zellen einer 15 cm Gewebekulturschale wurden für 2 Stunden mit oder ohne Hormon, bei 37°C, behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 2 ml Lysispuffer (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 0,5 % Natriumsarcosyl; 0,1 M Mercaptoethanol) lysiert und zwei Minuten homogenisiert. Nacheinander wurden 200 µl Natriumacetat, pH 4,0, sowie 2 ml Phenol (wassergesättigt) und 400 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und jeweils eine Minute gründlich gemischt. Danach wurde die Suspension für zehn Minuten bei 0°C inkubiert.

Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit einem Volumen Isopropanol 60 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die RNA 15 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat eine Stunde an der Luft getrocknet. Danach wurde das Präzipitat in 1 ml Lysispuffer resuspendiert, mit einem Volumen Isopropanol gefällt, zentrifugiert und die RNA zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut getrocknet. Abschließend wurde das Präzipitat in 100 µl zweifach destilliertem Wasser gelöst und photometrisch (bei 260 nm) die Konzentration der RNA-Lösung bestimmt.

4.3.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese in cDNA (copy-DNA) transkribiert. Für die Erststrangsynthese der cDNA wurde bei dieser Technik ein spezielles Set an Primern verwendet. Diese Primer bestehen aus einer Folge von 11 Desoxythymidinen am 5'Ende und zusätzlich zwei willkürlichen Basen am 3'Ende: 5'-d(T)₁₁VN-3'; dabei ist V eine der Basen A, C oder G und N eine der Basen A, C, G oder T. Daraus ergeben sich für den Erststrangprimer 12 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, die in getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt werden müssen.

100 ng Gesamt-RNA wurden mit 4 µl 5 x Reaktionspuffer (Gibco BRL) sowie 2,5 µM Erststrangprimer, 20 µM dNTPs, 1 µl RNasin und 300 U MMLV-RT (Gibco BRL) in einem Endvolumen von 20 µl gemischt und für 60 Minuten bei 35°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Temperatur anschließend für fünf Minuten auf 95°C erhöht.

4.3.3 Amplifikation der cDNA mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2 µl cDNA-Lösung wurden mit 10 x PCR-Puffer sowie 2 µM dNTPs, 2,5 µM d(T)₁₁ VN-Primer, 0,5 µM 5'-Primer (10-mer), 1,5 U Taq-Polymerase (AmpliTaq™, Cetus-Perkin-Elmer Cooperation) und 2 µCi ³²P-dCTP in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemischt und eine DNA-Amplifikation im Thermocycler durchgeführt. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt, wobei ein Zyklus wie folgt programmiert wurde: 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 1 Minute Hybridisierung der Primer bei 42°C und 30 Sekunden Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase bei 72°C. Beim letzten Zyklus wurde die Kettenverlängerung 10 Minuten durchgeführt. Nach der PCR-Amplifikation wurden je Reaktionsansatz 2 µl entnommen, mit je 1 µl DNA-Ladepuffer gemischt (20 % Glycerol; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol) und auf ein 6 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1500 V für ca. 3 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier eine Stunde bei 80°C unter Vakuum getrocknet und über Nacht bei -80°C autoradiographiert.

4.3.4 Isolierung, Reamplifikation und Klonierung der differentiell exprimierten Fragmente

Das Gel wurde mit Hilfe von Glogos (Stratagene) derart markiert, daß es nach der Autoradiographie mit dem Röntgenfilm ohne Probleme wieder zur Deckung gebracht werden konnte. Differentiell exprimierte DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem getrockneten Gel mitsamt dem Whatman-Papier ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und je nach Größe des Gelstückchens mit 100 oder 200 µl TE-Puffer 15 Minuten durchtränkt. Danach wurde die Lösung weitere 15 Minuten auf 95°C erhitzt. Um Geltrümmer und Whatman-Papier zu entfernen, wurde fünf Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt mit 300 mM Natriumacetat; 500 µg/ml Glycogen und 2,5 Volumen Ethanol gefällt und anschließend für 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und in der Speed vac getrocknet. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE-Puffer resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 4 µl eingesetzt, um in einer erneuten Polymerase Kettenreaktion das gewünschte Fragment anzureichern. Die Amplifikation erfolgte unter denselben Bedingungen und mit identischen Primern wie unter Punkt 4.3.3 beschrieben. Radioaktives α-³²P-dCTP wurde durch die entsprechende Menge destillierten Wassers ersetzt.

Der Reaktionsansatz wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt, die DNA mittels Ethidiumbromid angefärbt, das gewünschte Fragment mit

Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge 305 nm sichtbar gemacht und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde in ein Spin-X-Säulchen (Costar) überführt und 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat enthielt das amplifizierte DNA-Fragment. Das PCR-Fragment wurde nach Herstellerangaben direkt in den TA-Cloning Vektor (in vitro gene) ligiert, in Bakterien transformiert, auf Platten mit ampicillin- und IPTG-(40 µg/ml) haltigem Nährmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Die weißen Kolonien wurden in 3 ml ampicillinhaltiges Nährmedium überführt und bei 37°C über Nacht bei 150 rpm geschüttelt. Aus dieser Bakterienkultur wurde die Plasmid-DNA isoliert und das gesuchte Fragment durch Restriktionsverdau mit Eco RI aus dem Plasmid ausgeschnitten, auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend über Spin-X-Säulchen isoliert. Dieses Fragment wurde für Northern blot Analysen weiterverwendet.

Parallel zu der Northern blot Analyse wurde Plasmid-DNA im großen Maßstab isoliert. Diese Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.*, 1977 sequenziert. Diese Sequenzinformation wurde mit bereits bekannten Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken verglichen.

4.4 Northern blotting

5-10 µg RNA wurden lyophilisiert, in 20 µl Denaturierungspuffer (1 x PB; 50 % DMSO; 5,85 % deionisiertes Glyoxal) gelöst, 3 min bei 56°C inkubiert und in Eis gekühlt. Dann wurden 4 µl Ladepuffer (50 % Glycerin, 1 x PB; 0,04 % Bromphenolblau) zugegeben und die Proben auf ein 1 %-iges vertikales Agarosegel (11 cm x 14 cm x 0,5 cm) aufgetragen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x PB (0,01 M NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, pH 6,85) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte durch das Anlegen von 100 V Spannung an das Gel. Während der Elektrophorese wurde das Gel auf 4°C gekühlt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in Färbelösung (1,5 µg/ml Acridinorange in 1 x PB) 15 min gefärbt, 3 mal 30 min in 1 x PB entfärbt und schließlich die RNA mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert und die Stellen des Gels, an denen sich 28S und 18S ribosomale RNA befanden, wurden markiert. Dann wurde auf das Gel ein gleichgroßes Stück Hybond N⁺-Membran gelegt und die RNA auf die Membran transferiert. Dazu wurde 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 6,7) zuerst durch das Gel und dann durch die Membran gesaugt. Durch zweistündiges Erwärmen bei 80°C wurde die RNA kovalent an die Membran fixiert.

Die Hybridisierung des Filters erfolgte bei 65°C. Zunächst wurde der Filter für 2 h in Vorhybridisierungslösung (7 % SDS; 0,5 M Phosphatpuffer (1 M Phosphatpuffer: 2 M Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,2); 1 mM EDTA; 50 µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) inkubiert, dann wurde der Filter in Hybridisierungslösung (7 % SDS; 0,5 M

Phosphatpuffer; 1mM EDTA; 10 µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA; $1-3 \times 10^6$ cpm Hybridisierungsprobe (siehe Abschnitt 1.6.2)) ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Filter 30 min in Waschlösung 1 (40 mM Phosphatpuffer; 1 mM EDTA; 5 % SDS) und zweimal 30 min in Waschlösung 2 (40 mM Phosphatpuffer; 1 mM EDTA; 1 % SDS) bei 65°C gewaschen. Der Filter wurde, nachdem er kurz in 4 x SSC geschwenkt worden war, in Folie eingeschweißt. Abschließend wurde ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

Bevor der Filter für weitere Hybridisierungsproben verwendet werden konnte, mußte die gebundene radioaktive Hybridisierungsprobe durch 15 minütiges Kochen in 0,1 x SSC/ 0,1 % SDS entfernt werden. Anschließend wurde der Filter für 2 h vorhybridisiert.

Ergebnisse

Steroidhormonantagonisten sind synthetische Substanzen, die mit den natürlichen Liganden um die Bindung an den Hormonrezeptor konkurrieren.

Sie sind nicht oder nur eingeschränkt in der Lage, die Rezeptorantwort auszulösen und verhindern somit die Aktivierung des Hormonrezeptors durch dessen natürlichen Liganden. Steroidhormonantagonisten können ihre antagonistische Wirkung auf verschiedene Weise in der Signalkaskade klassischer Steroidhormone offenbaren:

1. Erhöhte Bindungsaffinität:

Aufgrund ihrer Struktur besitzen einige Antagonisten möglicherweise eine höhere Affinität zum Rezeptor als der natürliche Ligand und könnten daher in der Lage sein, den Hormon-Agonisten von der Ligandenbindestelle am Rezeptor zu verdrängen.

2. Einfluß auf die DNA-Bindung:

Die Bindung des Antagonisten an den Rezeptor verursacht möglicherweise eine strukturelle Änderung in der Konformation des Rezeptors. Diese Änderung könnte dazu führen, daß eine Bindung des Rezeptors an die DNA nicht mehr stattfinden kann.

3. Verhinderung der Transaktivierung:

Die Bindung eines Antagonisten an den Rezeptor führt möglicherweise zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Bindung an die DNA erlaubt, aber die Transaktivierung von Genen verhindert.

4. Verhinderung der Translokation des Rezeptors in den Kern:

Diejenigen Steroidhormonrezeptoren, die sich im inaktiven Zustand im Zytoplasma befinden, wandern nach Interaktion mit dem Agonisten in den Kern. Die Bindung eines Hormonantagonisten an den Rezeptor könnte die Translokation des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern verhindern.

Dies sind einige denkbare Möglichkeiten, wie Steroidhormonantagonisten die Wirkung von natürlichen Liganden unterdrücken können. Diese Einflüsse auf den Steroidhormonrezeptor werden durch besondere chemische Strukturmerkmale der Antagonisten hervorgerufen.

1. Struktur und Bezeichnung der Progesteron-Antagonisten

Im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Progesteron-Agonisten, wie beispielsweise dem Progesteron oder der synthetischen Verbindung R5020, unterscheiden sich die Progesteron-Antagonisten, wie beispielsweise RU486, an zwei Positionen, an dem für Steroidhormone charakteristischen Sterangerüst (siehe Abb. 1a):

- a. RU486 besitzt an der C11 Position einen 4-Dimethylaminophenyl-Rest. (vergl. Abb. 1a. Figur (3) mit (1) und (2)). Dieser Rest ist für die antigestagene Wirkung unbedingt erforderlich (Teutsch und Philibert, 1994).
- b. An der Position C17 unterscheidet sich RU486 bezüglich der Seitenkette.

RU486 oder Mifepriston ist der am besten untersuchte Progesteronantagonist. Neben seiner starken antigestagenen Wirkung besitzt RU486 jedoch auch sehr starke antigluocorticoide Eigenschaften. Für hochdosierte und langandauernde Anwendungen, wie z. B. für die Behandlung von Tumoren, sind beide Eigenschaften in einer Substanz nicht tolerierbar. Deshalb wurden neue Substanzen entwickelt, die gegenüber RU486 an den genannten Stellen Modifikationen aufweisen, welche die antigluocorticoide Wirkungen dieser Antiprogestine verringern sollen.

So sind beispielsweise die Substanzen ZK135694, ZK135695 und ZK137080 zusätzlich am Dimethylphenyl-Rest der C11 Position modifiziert.

Ein Teil der Antagonisten besitzt an der C17 Position einen 1-Propynyl-Rest, wohingegen andere Antagonisten eine 1-Hydroxypropyl-Seitenkette aufweisen (Abb. 1b).

Bei den Substanzen RU486 und ZK97397 befinden sich die Ringe C und D des Sterangerüsts in trans-Stellung zueinander, wodurch sich die C13 Methylgruppe in α -Position befindet. Bei allen weiteren Antagonisten sind die beiden Ringe C und D cisständig angeordnet. Eine trans-Konformation ergibt eine nahezu ebene, die cis-Konformation eine mehr bucklige Struktur der Antagonisten.

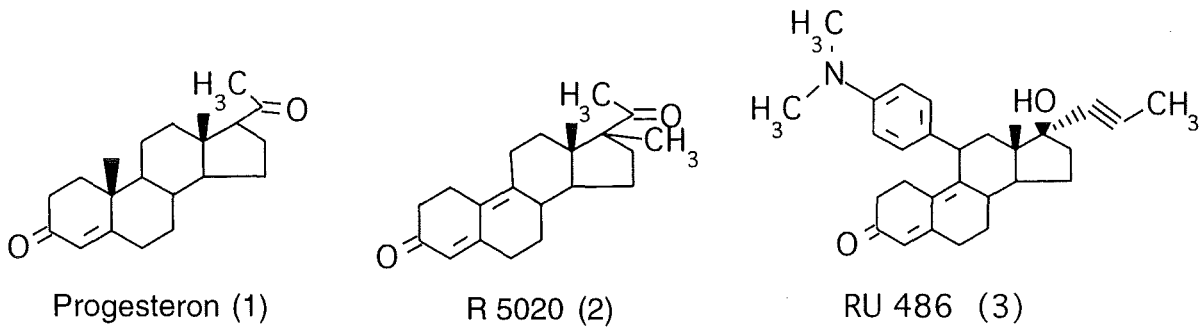


Abb.1a Progesteronagonisten. Die Substanz auf der linken Seite zeigt den natürlichen Agonisten Progesteron (1). In der Mitte abgebildet ist R5020 (2), ein synthetischer Agonist. Zum Vergleich ist rechts der Antagonist RU486 gezeigt.

Die Abbildung 1b. zeigt den Progesteronantagonisten RU486 sowie acht weitere Antigestagene, die gegenüber RU486 verschiedene Modifikationen an den oben genannten Positionen aufweisen.

2. Vergleich der antigestagenen und antiglucocorticoiden Wirkung der Antagonisten

Um den Einfluß der verschiedenen Modifikationen bezüglich der antiglucocorticoiden Wirkung der Antiprogestine zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente in Zellkultursystemen durchgeführt.

NIH3T3-Zellen, die lediglich den Glucocorticoidrezeptor exprimieren, wurden für diese Untersuchungen verwendet. Als Kontrolle wurde die antigestagene Wirkung dieser Substanzen in T47D-Zellen untersucht, die ihrerseits den Progesteronrezeptor exprimieren. Die verwendeten Zelllinien enthielten ein stabil transfiziertes Plasmidkonstrukt, welches zur Untersuchung von Promotoraktivitäten geeignet ist. Bei dem stabil transfizierten Genkonstrukt handelte es sich um Sequenzen des MMTV LTR (lange terminale Wiederholungssequenzen des Maus Mamma Tumor Virus) der Position -235 bis +122 (bezüglich der Startstelle der Transkription), die die Expression des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Gens kontrollieren. Diese MMTV LTR besitzen sogenannte HRE (hormone response element), d. h. Bindestellen für Steroidhormonrezeptoren darunter auch für den Glucocorticoid- und den Progesteronrezeptor (von der Ahe *et al.*, 1985).

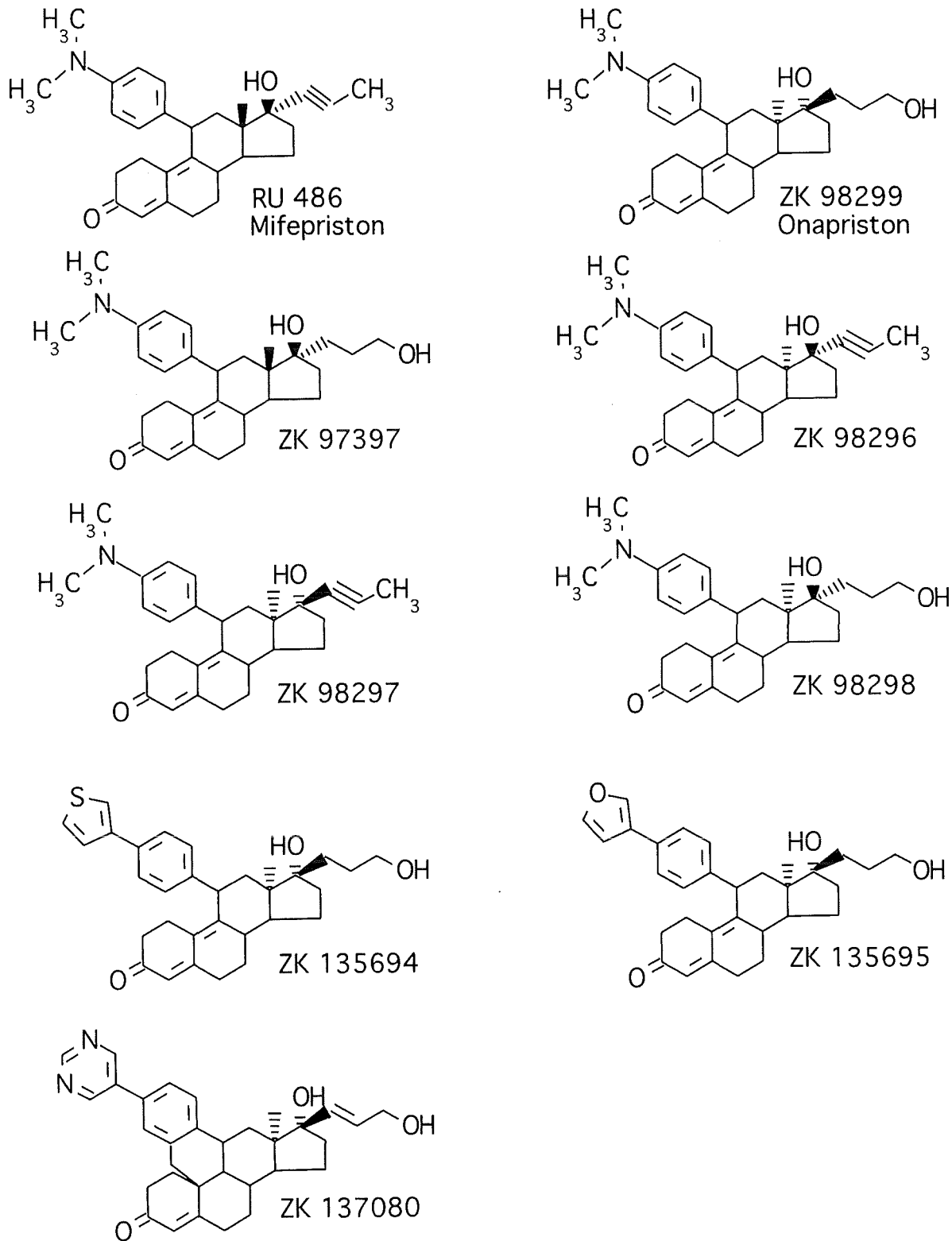


Abb. 1b Progesteronantagonisten. Links oben ist die Struktur von RU486 (Mifepriston), rechts daneben die Struktur von ZK98299 (Onapriston) dargestellt. Darunter sind die Derivate weiterer Progesteronantagonisten abgebildet.

Die Bindung eines hormoninduzierten Steroidrezeptors an das HRE aktiviert das nachfolgende Gen, in diesem Fall die Chloramphenicol-Acetyltransferase.

Der Vorteil dieses rekombinanten Genkonstruktes ist, daß das synthetisierte Genprodukt (CAT) mittels eines einfachen Enzymtests nachgewiesen werden kann (Gorman *et al.*, 1982). Die Chloramphenicol-Acetyltransferase überträgt Acetylgruppen von Acetyl-Coenzym A auf ^{14}C markiertes Chloramphenicol, wobei die mono- und diacetylierten Derivate des Chloramphenicols entstehen. Die Produkte dieser Enzymreaktion werden aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens durch eine Dünnschicht-Chromatographie voneinander getrennt. Dabei wandert das nichtacetylierte Chloramphenicol weniger weit als die mono- und die diacetylierten Formen des Chloramphenicols. Die quantitative Auswertung dieser Spots erfolgt mit Hilfe der Szintillationsmessung oder mittels eines Phosphoimagers. Die Enzymaktivität ist proportional zur Menge des umgesetzten Substrats, und ist somit ein direktes Maß für die Promotoraktivität des Indikatorgens. Werden bei diesem Assay gleiche Mengen an Protein eingesetzt, so können die Enzymaktivitäten aus verschiedenen Ansätzen miteinander verglichen werden.

Die stabil transfizierten NIH3T3- und T47D-Zellen wurden in 9 cm Gewebekulturschalen ausplattiert. NIH3T3-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10^{-8} M des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason, und alle T47D-Zellen mit 10^{-8} M des Progestins R5020 behandelt. Zusätzlich wurde von jeder Zelllinie jeweils einem der Ansätze eine 10-fach höhere Konzentration einer der Steroid-Antagonisten verabreicht. Anschließend wurden alle Ansätze geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und ein CAT-Assay durchgeführt.

In Abbildung 2 sind in einem Balkendiagramm die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die obere Hälfte der Grafik demonstriert die antigestagene Wirkung der verschiedenen Progesteronantagonisten. Mit Ausnahme von ZK98298 bewirken alle getesteten Antiprogestine eine Hemmung der Progesteronrezeptor-Aktivität von 90 % und darüber. ZK98298 hemmt die Wirkung von R5020 in diesem System lediglich zu 55 % und ist deshalb gegenüber den anderen Substanzen ein schwacher Progesteronantagonist.

Der untere Teil der Abbildung 2 veranschaulicht die inhibierende Wirkung der Progesteronantagonisten bezüglich der Glucocorticoidrezeptor-Aktivität. Es wird deutlich, daß außer RU486 auch die Substanzen ZK98296, ZK98297 und ZK135694 eine sehr starke Antigluco-corticoidwirkung aufweisen. Die Substanzen ZK98299, ZK135695 sowie ZK137080 haben eine etwas geringere Antigluco-corticoidwirkung als RU486 und die Substanzen ZK97397 und ZK98298 zeigen eine Hemmung von 50 % und 35 % der Glucocorticoidrezeptor-Aktivität und besitzen somit die schwächste antigluco-corticoide Wirkung im Vergleich zu den anderen Progesteronantagonisten.

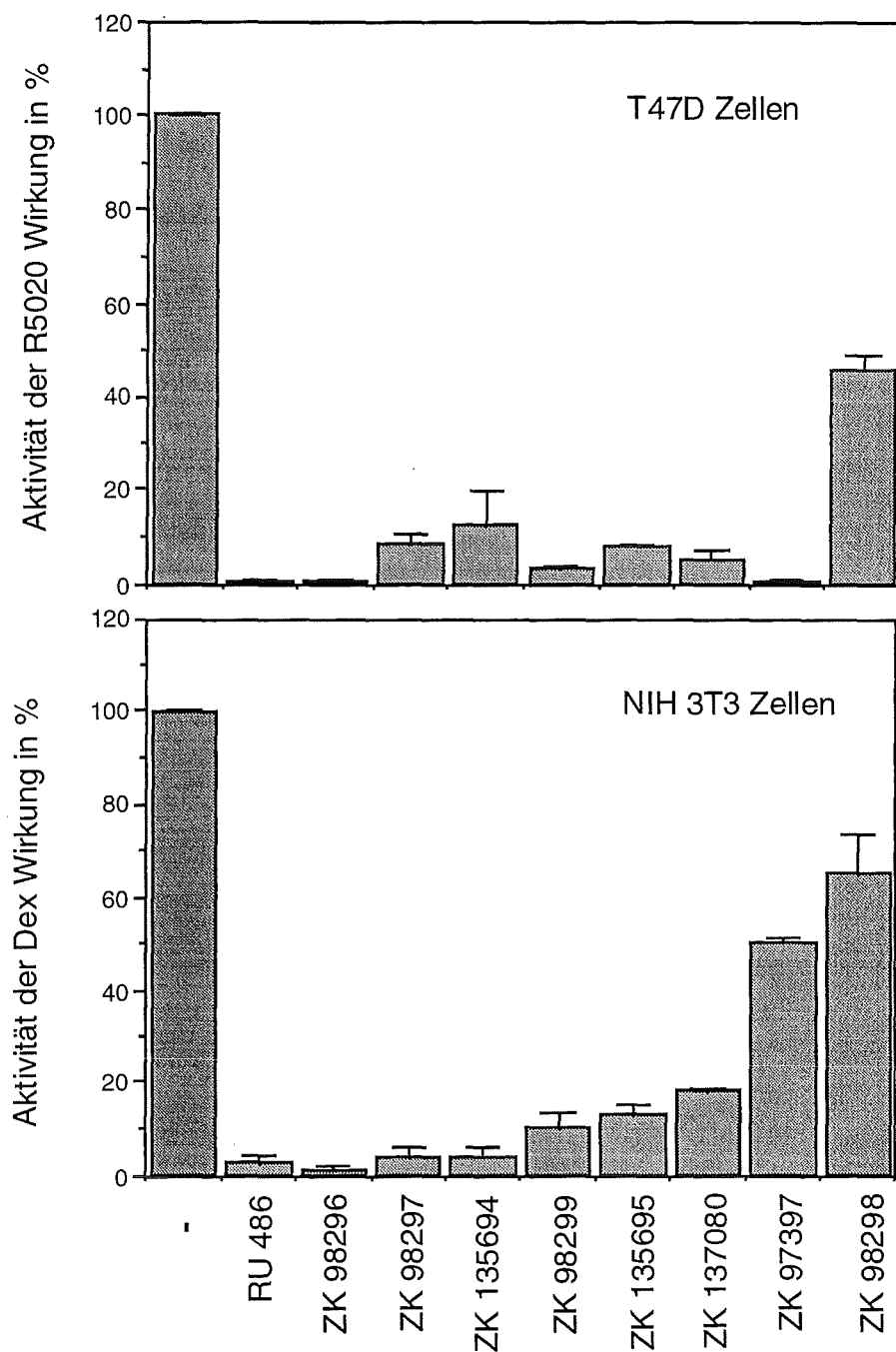


Abb. 2 Hemmung der Progesteron- und Dexamethason-Aktivität durch verschiedene Hormonantagonisten. Stabil mit einem MMTV-CAT Konstrukt transfizierte T47D-(oberes Diagramm) und NIH3T3-Zellen (unteres Diagramm) wurden in An- oder Abwesenheit der Antagonisten mit 10^{-8} M R5020 oder Dexamethason behandelt. Die Konzentration der Antagonisten betrug 10^{-7} M.

24 Stunden nach der Hormonbehandlung wurden die Zellen geerntet und ein CAT-Assay durchgeführt. Die Abbildungen zeigen die Restaktivität der jeweiligen Agonisten nach der Behandlung mit den Antagonisten. Die Werte für R5020 und Dexamethason alleine wurden auf 100 % gesetzt, die Repression durch die Antagonisten entsprechend berechnet.

Die Experimente zeigen, daß die Antiglucocorticoidwirkung nicht notwendigerweise mit der Antiprogestinwirkung korreliert, da beispielsweise die Substanz ZK97397 ein starkes Antiprogestin aber gleichzeitig ein schwaches Antiglucocorticoid darstellt. Im Vergleich dazu ist RU486, unter gleichen Bedingungen, ein starkes Antiglucocorticoid. Ihre geringe antiglucocorticoide Wirkung hebt die Substanzen ZK97397 und ZK98298 gegenüber anderen Antiprogestinen mit deutlich stärkerer Antiglucocorticoidwirkung hervor. Für weitere Untersuchungen wurden deshalb diese beiden Substanzen mit der Wirkung von RU486, als Kontrolle, verglichen. Alle anderen Antagonisten wurden in diesem Teil der Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

3. Konzentrationsabhängige Antiglucocorticoidwirkung von ZK97397 und ZK98298

Die geringe antiglucocorticoide Wirkung der Substanzen ZK97397 und ZK98298 ist möglicherweise auf eine schwache Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor zurückzuführen. Daher ist es denkbar, daß die Substanzen bei einer Konzentration von 10^{-7} M nur schwach wirksam sind, bei steigender Hormonkonzentration jedoch ebenfalls starke antiglucocorticoide Eigenschaften besitzen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden stabil transfizierte NIH3T3-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 wie im vorhergehenden Experiment behandelt. In Abbildung 3 ist die Antiglucocorticoid-Wirkung der Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486 in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis dargestellt.

Das Resultat dieses Experiments zeigt klar, daß die beiden Antihormone ZK97397 und ZK98298 in der Lage sind, die Glucocorticoidantwort mit steigender Konzentration der Antagonisten stärker zu hemmen. Hingegen zeigt RU486 als starkes Antiglucocorticoid bereits bei einer äquimolaren Konzentration von 10^{-8} M eine maximale Hemmung des Glucocorticoidrezeptors. Um eine vergleichbare Hemmung zu erhalten wie mit RU486, müssen weit höhere Konzentrationen an ZK97397 oder ZK98298 eingesetzt werden. Für eine halbmaximale Hemmung der Dexamethasonantwort (ED_{50}), müssen die Substanzen ZK97397 oder ZK98298 in einer 500- bzw. 800-fach höheren Konzentration verwendet werden als RU486. Hingegen hat die Erhöhung der RU486-Konzentration von 10^{-8} M auf 5×10^{-5} M nur noch einen geringen Einfluß auf die Repression der Dexamethasonwirkung.

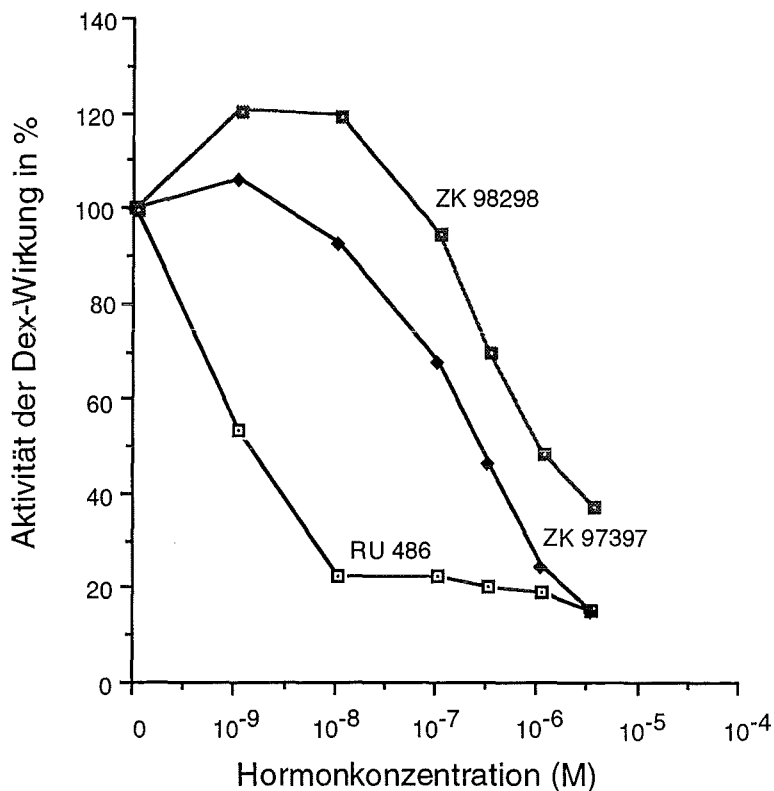


Abb. 3 Konzentrationsabhängigkeit der Antigluocorticoid-Wirkung der Antihormone RU486, ZK97397 und ZK98298. Stabil mit einem MMTV-CAT Konstrukt transfizierte NIH3T3-Zellen wurden mit 10^{-8} M Dexamethason und verschiedenen Konzentration (10^{-9} M bis 5×10^{-5} M) der Antihormone ZK97397, ZK98298 und RU486 behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und ein CAT-Assay durchgeführt. Die Grafik zeigt die prozentuale Repression der Dexamethason-Wirkung durch die jeweiligen Antagonisten bei den angegebenen Konzentrationen.

Diese enormen Unterschiede zwischen den Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486 bezüglich ihrer antigluocorticoiden Wirkung könnten möglicherweise eine verringerte Affinität der Substanzen ZK97397 und ZK98298 oder aber mögliche agonistische Effekte der beiden Antagonisten, die eine geringe antagonistische Wirkung vortäuschen, zum Glucocorticoidrezeptor widerspiegeln.

Zur Aufklärung der Mechanismen, die zu dieser verringerten Antigluocorticoid-Wirkung bei geringen Konzentrationen beitragen, wurden sowohl die Bindungsaffinitäten der Antihormone zum Glucocorticoidrezeptor, als auch eine mögliche agonistische Wirkung der Substanzen ZK97397 und ZK98298 untersucht.

4. Die schwache antiglucocorticoide Wirkung von ZK97397 und ZK98298 ist nicht ausschließlich einer reduzierten Affinität zum Glucocorticoidrezeptor zuzuschreiben

Steroidhormone werden in sehr geringen Mengen synthetisiert und über den Blutstrom zu den jeweiligen Zielorganen transportiert. Dort binden sie mit hoher Spezifität an ihren Rezeptor. Dies setzt eine hohe Affinität zwischen Liganden und Rezeptor voraus. Die Affinität, mit der verschiedene Liganden an denselben Rezeptor binden, kann durch die Berechnung der relativen Bindungsaffinität (RBA) bestimmt werden. Bei dieser Methode wird der Rezeptor mit einem radioaktiv markierten Hormon beladen, welches durch Zugabe der nichtmarkierten Antihormone verdrängt wird. Hierzu werden die Konzentrationen des unmarkierten Hormons (H_{50}) sowie des unmarkierten Antihormons (AH_{50}) bestimmt, die notwendig sind, um 50 % des markierten Hormons vom Rezeptor zu verdrängen. Das Verhältnis von H_{50} / AH_{50} ist ein Maß für die RBA des Liganden an den Rezeptor.

Um die RBA der Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486 zum Glucocorticoidrezeptor zu bestimmen, wurden HTC-Zellen, welche den Glucocorticoidrezeptor in hoher Zahl exprimieren, 3 Tage in Medium mit hormonfreiem Serum kultiviert. Hormonfreies Serum wurde verwendet, um sicher zu sein, daß der Rezeptor vor der Behandlung mit radioaktiv markiertem Hormon nicht durch geringe Spuren von unmarkiertem Hormon aus dem Serum besetzt ist. Anschließend wurden die Zellen geernetet, Gesamtzellextrakte präpariert und alle Ansätze mit tritiummarkiertem Dexamethason (10^{-8} M) inkubiert. Ein Ansatz enthielt ausschließlich radioaktiv markiertes Dexamethason. Alle weiteren Ansätze wurden zusätzlich mit der äquimolaren, der 10- und der 100-fachen Menge nichtmarkiertem Dexamethason oder der entsprechenden Menge eines der Antihormone ZK97397, ZK98298 oder RU486 behandelt. Nichtgebundene, radioaktiv markierte Liganden wurden durch Zugabe von dextranbehandelter Aktivkohle, an welche die freien Liganden adsorbiert haben, aus den Reaktionsansätzen entfernt. Die Abtrennung der Aktivkohle erfolgte durch Zentrifugation. Anschließend wurde die rezeptorgebundene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

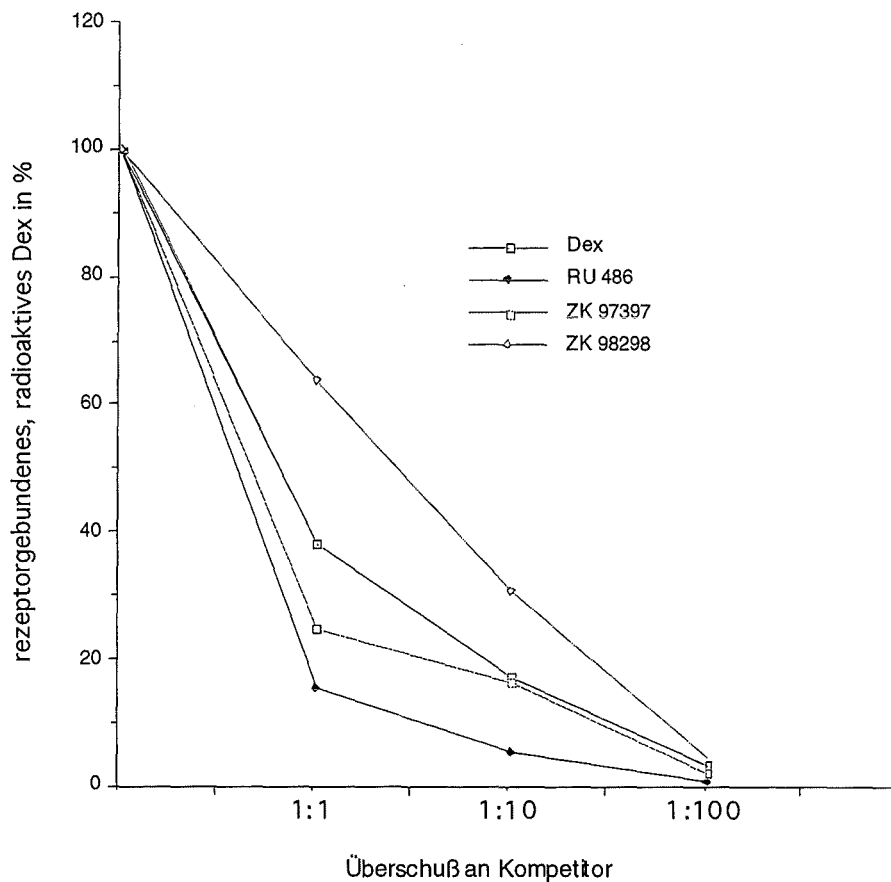


Abb. 4 Verdrängung von radioaktiv markiertem Dexamethason vom Glucocorticoidrezeptor durch nichtmarkiertes Dex oder durch verschiedene Antagonisten. Rattenleberzellen wurden mit tritiummarkiertem Dexamethason behandelt. Nach Zugabe einer äquimolaren Menge, 10-facher oder 100-facher Überschuß an unmarkiertem Dexamethason oder der angegebenen Liganden wurde die noch gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Graphik zeigt die Abnahme von rezeptorgebundenem, markiertem Dexamethason nach Zugabe steigender Mengen an nichtmarkiertem Dexamethason oder der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486.

Abbildung 4 zeigt die Verdrängung von radioaktivem Dexamethason vom Glucocorticoidrezeptor durch nicht markiertes Dexamethason sowie den drei Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486. Die Konzentrationen der nichtmarkierten Liganden (H_{50} und AH_{50}), die 50 % des markierten Dexamethasons vom Rezeptor verdrängen, wurden aus der Grafik bestimmt. Anschließend wurden die Werte für Dexamethason (H_{50}) und die jeweiligen Antagonisten (AH_{50}) zueinander ins Verhältnis gesetzt (H_{50}/AH_{50}).

Das Verhältnis für Dexamethason wurde auf 100 gesetzt, die Werte für die Antagonisten entsprechend berechnet. Dabei ergab sich für ZK97397 einen Wert von 120, für ZK98298 einen Wert von 20 und für RU486 einen Wert von 140. Werte größer 100 bedeuten eine

höhere Affinität zum Rezeptor als Dexamethason, Werte kleiner als 100 stehen für eine schlechtere Rezeptoraffinität als Dexamethason.

Durch die Bestimmung der RBA wird deutlich, daß eine hohe Affinität des Antagonisten zum Glucocorticoidrezeptor nicht notwendigerweise mit einer starken Antigluocorticoidwirkung korreliert. Da die Bindungsaffinität von ZK97397 und RU486 annähernd identisch ist, kann die geringere Antigluocorticoidwirkung von ZK97397 nicht alleine durch eine schwache Bindung an den Glucocorticoidrezeptor erklärt werden, obwohl dies für den Antagonisten ZK98298 durchaus der Fall sein kann.

Für die schwache antigluocorticoide Aktivität von ZK97397 spielen demnach noch andere Faktoren eine Rolle. So ist es denkbar, daß diese Substanz zusätzlich agonistisch auf den Glucocorticoidrezeptor wirkt.

5. Agonistische Wirkung der Hormonantagonisten ZK97397 und ZK98298 bezüglich des Glucocorticoidrezeptors

Eine agonistische Wirkung von Steroidhormonen führt zur Bindung des Rezeptors an die DNA und die Verstärkung der Transkription hormonabhängiger Gene. Deshalb wurde der Untersuchung einer möglichen agonistischen Wirkung der Antiprogestine die Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften dieser Antihormone vorangestellt. Eine Studie von Klein-Hitpass *et al.* (1991) hat gezeigt, daß sich Antiprogestine, bezüglich ihrer DNA-Bindungseigenschaften, in zwei Gruppen einteilen lassen, wobei eine Gruppe von Antagonisten nicht in der Lage ist, nach Interaktion mit dem Rezeptor an die DNA zu binden. Bei der zweiten Gruppe von Antagonisten kommt es zur Bindung des Rezeptors an die DNA, die Aktivierung von Genen bleibt jedoch aus.

Um eine mögliche Antagonist-induzierte Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die DNA zu untersuchen, wurden *in vivo* DNA-Bindungsstudien durchgeführt. Anschließend sollte eine mögliche agonistische Wirkung der Substanzen untersucht werden, wobei in Northern blot Experimenten und CAT-Assays die Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486 miteinander verglichen wurden.

5.1 *In vivo* Glucocorticoidrezeptor Bindungsstudien am Promotor des Tyrosinaminotransferase Gens

Das Tyrosinaminotransferasegen der Ratte wird auf Transkriptionsebene durch Glucocorticoide reguliert. Im Promotorbereich dieses Gens konnten entsprechende

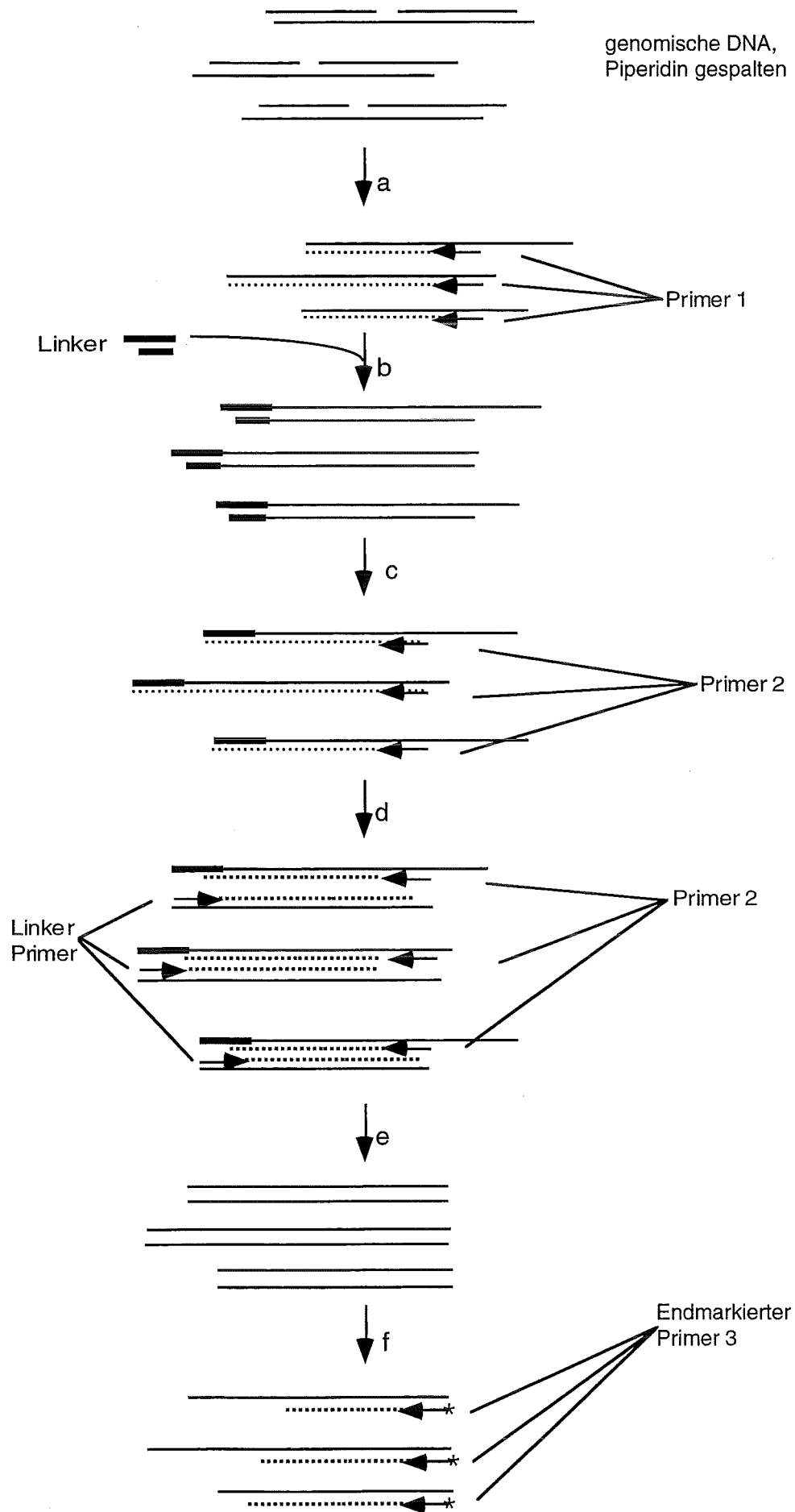
glucocorticoid response elements (GREs) nachgewiesen werden, an die der Rezeptor bindet.

Die Bindung des Rezeptors an die DNA lässt sich mit Hilfe der *in vivo* footprint Analyse nachweisen. Dabei werden solche Purinbasen der genomischen DNA mittels Dimethylsulfat (DMS) spezifisch methyliert, die nicht an der Bindung des Rezeptors involviert sind. Diese Purinbasen werden anschließend durch Piperidin gespalten.

Die Spaltprodukte werden mit Hilfe der ligationsvermittelten Polymerasekettenreaktion (ligation mediated polymerase chain reaction, LMPCR) (Mueller und Wold, 1989) selektiv amplifiziert und radioaktiv markiert. Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über diese Technik.

Nach Auftrennung der Produkte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel und direktem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* methylierten DNA wird sichtbar, aufgrund unterschiedlicher Fragmentierung der DNA, wo es zuvor zu spezifischer Proteinbindung gekommen ist.

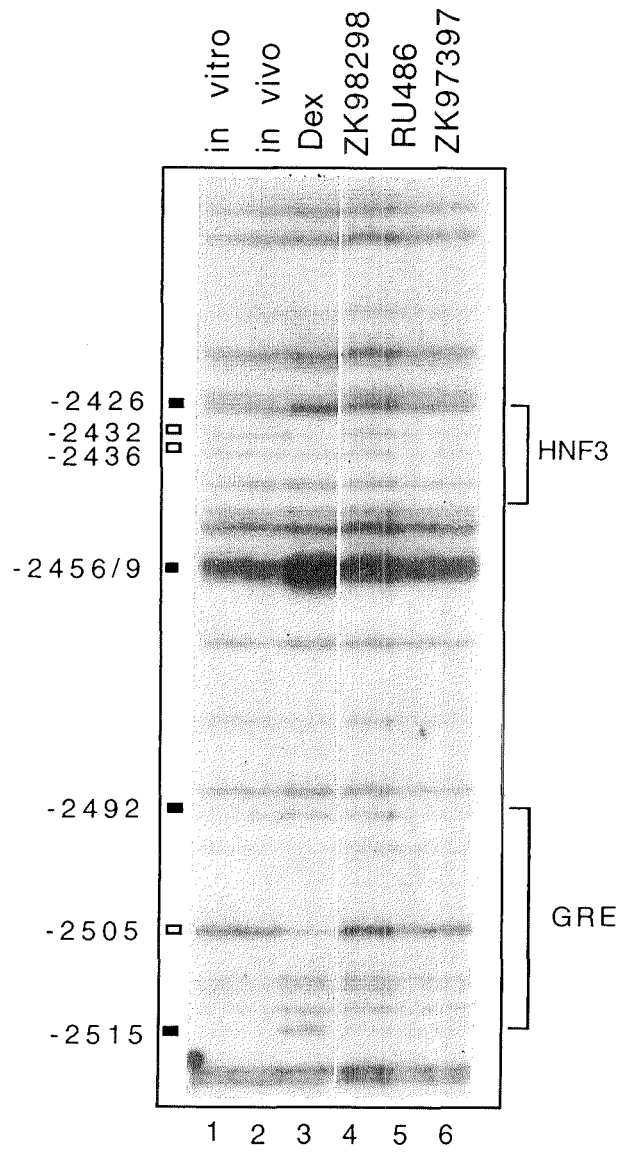
Abb. 5 Schematische Darstellung der genomischen "footprint"-Analyse durch LMPCR (nach Muller und Wold, 1989). Genomische DNA wurde *in vitro*- bzw. *in vivo* methyliert und mit Piperidin gespalten. Im ersten Schritt wird durch Hybridisierung des ersten genspezifischen Oligonukleotids (Primer 1) das 5'-Ende der Fragmente festgelegt. Die Verlängerung des Primers führt zu glatten Enden, an die ein Linker angefügt wird (b). Nach Hybridisierung eines zweiten genspezifischen Primers (Primer 2) und anschließender Strangverlängerung, erhält man DNA-Fragmente, die nun klar definierte Enden besitzen (d). Diese Konstellation ermöglicht nun die Amplifikation dieser Fragmente mittels PCR mit dem Linkerprimer und dem Primer 2 (e). In der letzten Runde der PCR-Reaktion, werden die Fragmente mit Hilfe eines radioaktiv markierten, ebenfalls genspezifischen Primer 3 markiert, über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.



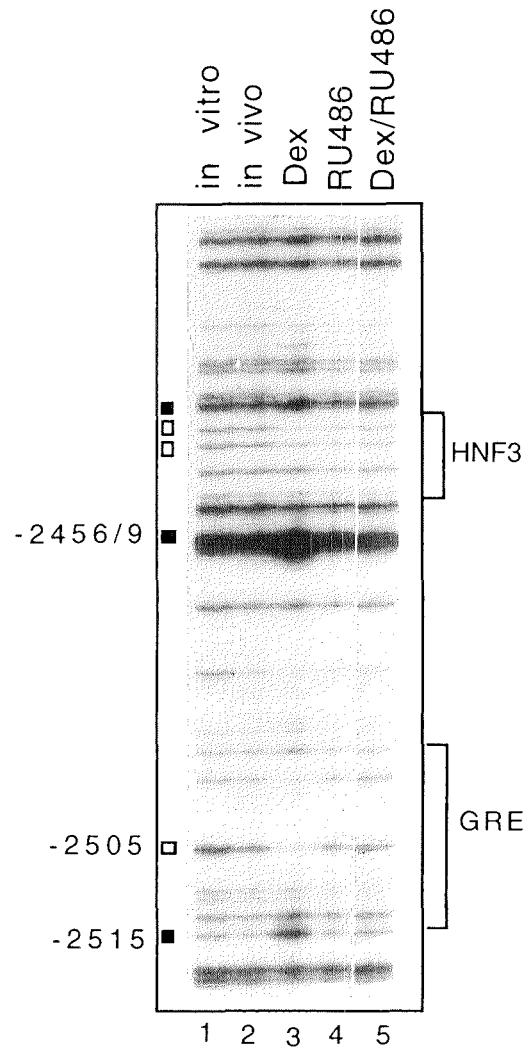
Diese Untersuchungen wurden in einer Rattenhepatomzelllinie (FTO-Zellen) durchgeführt, die sich dadurch auszeichnet, daß sie den Glucocorticoidrezeptor, sowie, nach Behandlung mit Dexamethason, verstärkt das Gen für die Tyrosinaminotransferase (TAT) exprimieren. Ein Teil der Zellen wurde für zwei Stunden mit 10^{-8} M Dexamethason, sowie 10^{-7} M ZK97397, ZK98298, RU486 oder mit einer Kombination aus Dexamethason und einem der Antagonisten behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Hormonbehandlung und gereinigte DNA verwendet. Die Zellen wurden für zwei Minuten mit DMS behandelt und anschließend die DNA aus den Zellen isoliert. Isolierte genomische DNA aus unbehandelten Zellen wurde nur 20 Sekunden lang *in vitro* methyliert, da gereinigte DNA leichter mit DMS reagiert als im Zellkern verpackte DNA. Die methylierte DNA der verschiedenen Ansätze wurde mit Piperidin gespalten und die entstandenen Fragmente durch die ligationsvermittelte PCR amplifiziert und radioaktiv markiert. Der Promotor des TAT-Gens besitzt zwei Bindestellen für den Glucocorticoidrezeptor. Davon befindet sich eine Bindestelle im Bereich um die Position -2500 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt. Die zweite Bindestelle bei der Position -5000 bp (Becker *et al.*, 1986; Rigaud *et al.*, 1991). Die markierten Fragmente wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und zur Detektion der Signale autoradiographiert. Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis verschiedener footprint-Analysen in der Region um -2500 bp.

Abb. 6 *In vivo* footprint Analyse nach Behandlung von Rattenleberzellen (FTO) sowohl mit Dexamethason als auch verschiedenen Antagonisten.

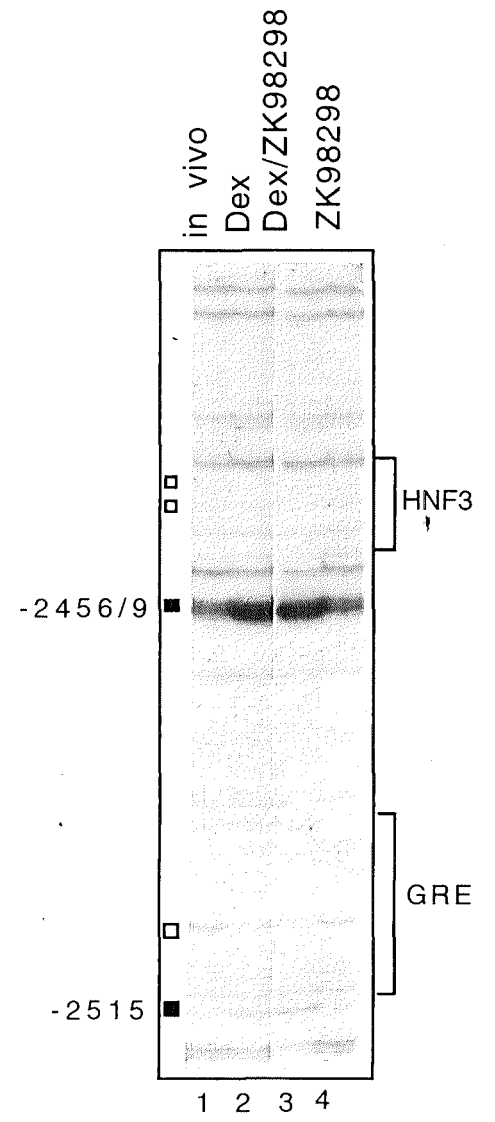
FTO-Zellen, die sowohl den Glucocorticoidrezeptor als auch das Gen für die Tyrosinaminotransferase exprimieren, wurden für zwei Stunden ohne Hormon oder mit den angegebenen Hormonen behandelt. Die Zellen wurden *in vivo* und nackte DNA *in vitro* mit DMS methyliert und anschließend mit Piperidin gespalten. Die gewünschten DNA-Fragmente (zwischen -2400 und -2520) wurden mittels sequenzspezifischer Primer amplifiziert und radioaktiv markiert. Anschließend wurden sie über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Eine der Bindestellen für den Glucocorticoidrezeptor (-2505) sowie für den Faktor HNF3 (-2430) sind jeweils rechts eingezeichnet. Footprints sind mit einem offenen Rechteck, Hypermethylierungsstellen mit einem schwarzen Rechteck kenntlich gemacht.



A



B



C

Vergleicht man das Muster *in vitro* methylierter mit der Dexamethason behandelten, *in vivo* methylierten DNA, so fällt auf, daß im Bereich des GRE, um die Position -2505, eine Abschwächung einer Bande nach Dexamethasonbehandlung eintritt (vergl. Abb. 6 A, B Spur 1 mit 3 und 6 C, Spur 1 mit 2). Dieses Guanin liegt innerhalb der Erkennungssequenz (TGTTCT) für den Glucocorticoidrezeptor. Die Abschwächung dieser Bande ist ein Hinweis darauf, daß an dieser Stelle nach der Hormonbehandlung der Rezeptor an die DNA gebunden hat. Eine Verstärkung der Signale bei den Positionen -2426, -2456 bis -2459, -2492 sowie bei -2515 deuten auf eine Hypermethylierung und eine bevorzugte Spaltung dieser Guanine hin. Solche hypermethylierten Stellen lassen sich aufgrund einer Konformationsänderung der DNA durch Protein-DNA Interaktion erklären (Hornstra *et al.*, 1993).

Wurden die Zellen gleichzeitig mit Dexamethason und einem zehnfachen Überschuß an RU486 behandelt, so ändert sich das Spaltungsmuster gegenüber der mit Dexamethason behandelten Zellen an der Position -2505, wo die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die DNA nachgewiesen wurde. Dexamethason ist, in Gegenwart von RU486, nicht in der Lage, die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die DNA zu bewirken (Abb. 6 B, vergleiche Spur 3 und 5). Dieses Ergebnis ist offensichtlich ein Grund für die starke antiglucocorticoide Wirkung von RU486.

Wurden die Zellen hingegen mit Dexamethason und einem zehnfachen Überschuß beispielsweise an ZK98298 behandelt, so findet man dasselbe Spaltungsmuster wieder, wie es für die Behandlung mit Dexamethason alleine charakteristisch ist (Abb. 6 C, vergleiche Spur 2 und 3, an der Position -2505). Das schwache Antigluocorticoide ZK98298 ist auch in zehnfach höherer Konzentration nicht in der Lage, die durch Dexamethason induzierte Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die DNA zu verhindern.

Diejenigen Ansätze, die mit den Hormonantagonisten ZK97397, ZK98298 sowie RU486 (Abb. 6 A, Spuren 4, 5, 6) alleine behandelt wurden, zeigen gegenüber des *in vitro* methylierten Ansatzes keine Veränderung im Spaltungsmuster.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Antagonisten für sich alleine nicht in der Lage sind, die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an die DNA zu bewirken.

Diese Experimente zeigen, daß RU486, als starkes Antigluocorticoide die Bindung des Dexamethason-induzierten Glucocorticoidrezeptors an die DNA hemmt, was den schwachen Antigluocorticoiden, z. B. ZK98298, unter gleichen Bedingungen nicht möglich ist. ZK97397, ZK98298 sowie RU486 alleine verabreicht, zeigen keine Unterschiede in der footprint Analyse (vergl. Abb. 6 A).

Nach den hier gezeigten Ergebnissen ist RU486, alleine verabreicht, nicht in der Lage, die Bindung des GR an die DNA zu bewirken. Untersuchungen von Simons *et al.*, (1992) zeigen jedoch, daß RU486 dennoch schwache glucocorticoide Wirkung besitzt. Obwohl die Substanzen ZK97397 und ZK98298 ebenfalls keine Bindung des GR an die DNA induzieren, was möglicherweise deren schwache antiglucocorticoide Wirkung erklären

könnte, ist eine agonistische Wirkung dieser beiden Substanzen auf den GR, wie im Falle von RU486, nicht ausgeschlossen. Deshalb wurde die agonistische Wirkung der Substanzen sowohl in Northern blot Experimenten als auch in Transfektionsexperimenten untersucht.

5.2 Die Hormonantagonisten ZK97397 und ZK98298 besitzen keine agonistische Wirkung bezüglich des Glucocorticoidrezeptors

5.2.1 Northern blot Analyse der Expression des Tyrosinaminotransferase-Gens in FTO-Zellen

Die Untersuchung möglicher agonistischer Aktivitäten der Antiprogestine ZK97397 und ZK98298 wurde in FTO-Zellen durchgeführt, bei denen die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an den Promotor des TAT-Gens bereits in *in vivo* footprinting-Analysen nachgewiesen werden konnte. In diesem Experiment wurde die Expression des Tyrosinaminotransferase-Gens, nach Behandlung mit den Hormonantagonisten, in Northern blot Analysen untersucht.

Jeweils ein Ansatz der FTO-Zellen wurde mit Dexamethason oder einem der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 behandelt. Einem Ansatz wurde kein Hormon verabreicht. Vier Stunden danach wurden die Zellen geerntet und die mRNA aus den Zellextrakten isoliert. Die mRNA der verschiedenen Ansätze wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit zwei radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert, die einerseits die mRNA für die Tyrosinaminotransferase und zum anderen die mRNA für das Protein Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erkannten.

Die Abbildung 7 zeigt die Autoradiographie des Northern blots, sowie dessen densitometrische Auswertung.

Die Hybridisierung der Nylonmembran mit einer TAT-Sonde zeigt ein starkes Signal für denjenigen Ansatz, welcher mit Dexamethason behandelt wurde (Abb. 7a, Spur 2). Im Balkendiagramm (Abb. 7b) ist deutlich zu erkennen, daß die Behandlung der Zellen mit den Hormonantagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 zu keiner signifikant erhöhten Expression von mRNA der Tyrosinaminotransferase geführt hat. Dieses Experiment zeigt, daß die Progesteronantagonisten in diesem System keine agonistische Wirkung durch den Glucocorticoidrezeptor zeigen.

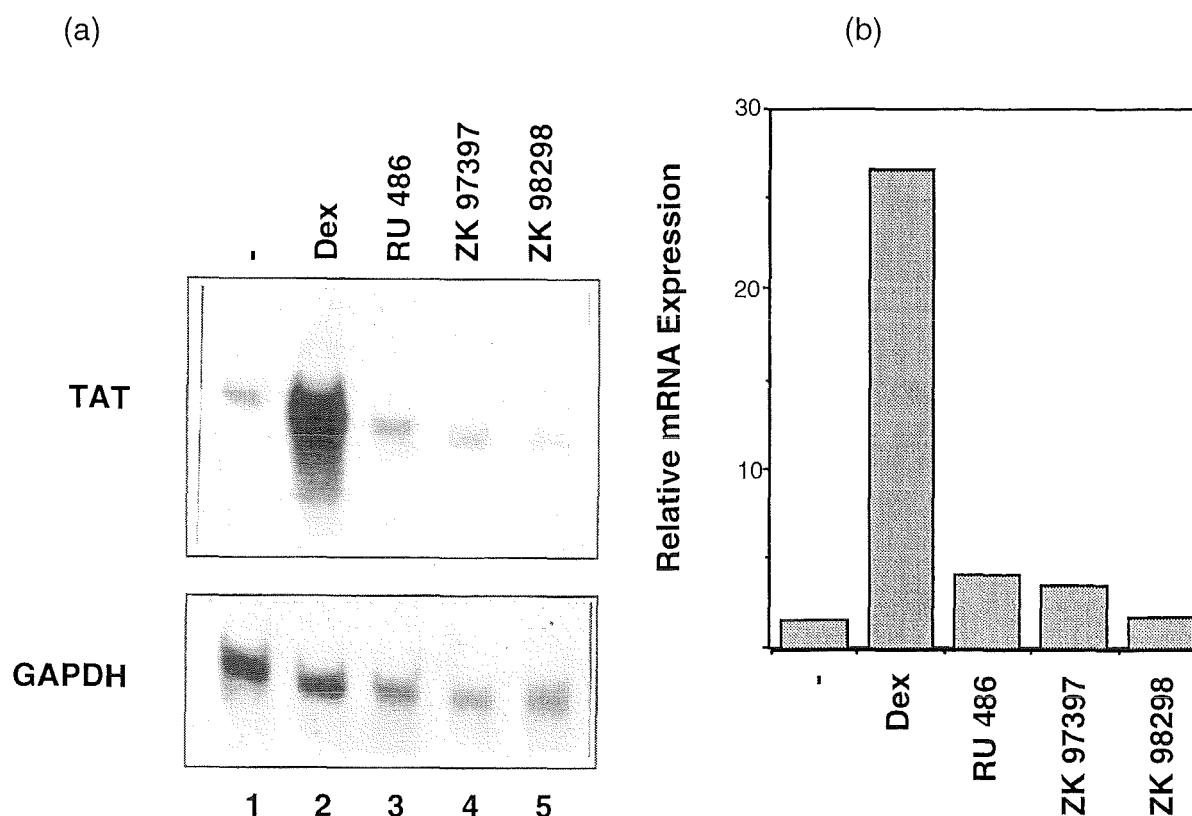


Abb. 7a,b Northern blot Analyse (a) und densitometrische Auswertung (b) der TAT-Genexpression nach Behandlung von FTO-Zellen mit verschiedenen Hormonantagonisten. FTO-Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Hormonen (10^{-7} M) behandelt. Die Zellen wurden geerntet und die mRNA isoliert. Die RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen TAT und GAPDH hybridisiert. In (b) ist die densitometrische Auswertung der Northern blot Signale in einem Balkendiagramm dargestellt.

5.2.2 Aktivierung des MMTV-Promotors durch Progesteronantagonisten

Northern blot Analysen am Tyrosinaminotransferase Gen von Rattenhepatomazellen ergaben keinen Hinweis auf einen agonistischen Einfluß der Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486. Da die aktivierende Wirkung vieler Transkriptionsfaktoren jedoch häufig sowohl zelltyp- als auch promotorabhängig reguliert ist, wurden zwei weitere Zelllinien, CV 1- und NIH3T3-Zellen, auf eine mögliche agonistische Wirkung der Substanzen durch den Glucocorticoidrezeptor hin untersucht.

Für diese Experimente wurden Mausfibroblastenzellen (NIH3T3) verwendet, die sowohl den Glucocorticoidrezeptor als auch ein MMTV-CAT Konstrukt stabil exprimieren. Diese Zellen wurden in einer der vorangehenden Untersuchungen dazu benutzt, die antiglucocorticoide Wirkung der Progesteronantagonisten zu bestimmen.

Parallel dazu wurde sowohl der Glucocorticoidrezeptor als auch das MMTV-CAT Konstrukt in Affennierenzellen (CV 1) transient transfiziert. Nach der Transfektion der CV 1-Zellen wurden verschiedene Ansätze dieser als auch der NIH3T3-Zellen mit Dexamethason, ZK97397, ZK98298 und RU486 behandelt. Je einem Kontrollansatz wurde kein Hormon verabreicht. Die Zellen wurden geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und CAT-Assays durchgeführt. Die Balkendiagramme in Abbildung 8a,b zeigen das Ergebnis dieser Transfektionsexperimente.

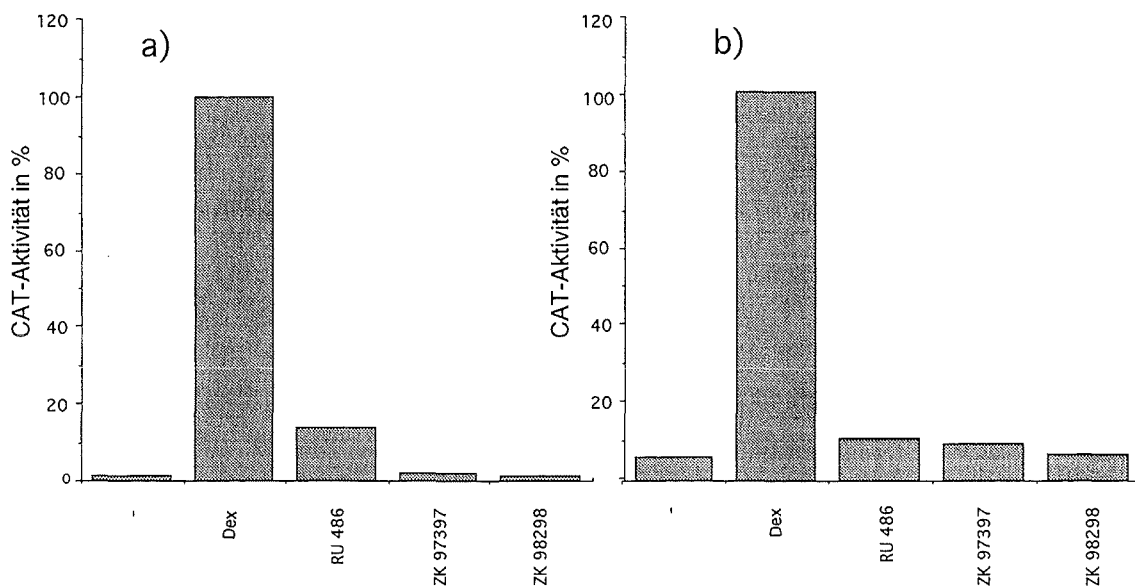


Abb. 8 a, b Agonistische Wirkung der Hormonantagonisten in CV 1- (a) und NIH3T3-Zellen (b). CV 1-Zellen wurden transient mit einem MMTV-CAT-Konstrukt und dem Glucocorticoidrezeptor kotransfiziert. NIH 3T3-Zellen sind sowohl mit dem Rezeptor als auch einem MMTV-CAT-Konstrukt stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Hormonen (10^{-7} M) behandelt und ein CAT-Assay durchgeführt. Die CAT-Aktivität eines charakteristischen Experiments wurde in den Balkendiagrammen dargestellt. Dabei wurde jeweils die Induktion der Expression des CAT-Gens durch Dexamethason auf 100 % gesetzt. Alle weiteren Werte wurden entsprechend berechnet.

Sowohl in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen als auch in transient transfizierten CV 1-Zellen wird die Expression des Gens für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) durch Dexamethason induziert. Hingegen ist in beiden Zelllinien keine signifikant erhöhte

Expression des CAT-Gens durch ZK97397 oder ZK98298 nachweisbar. RU486 verhält sich in beiden Systemen unterschiedlich: Während RU486 in NIH3T3-Zellen nicht in der Lage ist die Expression des CAT-Gens zu induzieren, besitzt RU486 in CV 1-Zellen deutlich über 10 % transaktivierende Wirkung, verglichen mit der Wirkung von Dexamethason.

Neben zelltypspezifischen Faktoren, die dieses Ergebnis bewirken können, ist es auch möglich, daß die unterschiedliche Verpackung des MMTV Promotorkonstrukts in stabil und transient transfizierten Zelllinien zu diesen Unterschieden beiträgt.

Obwohl RU486 eine zelltyp- und möglicherweise promotorspezifische agonistische Wirkung besitzt, zeigen die Antagonisten ZK97397 und ZK98298 weder in den hier beschriebenen Transfektionsexperimenten noch in den vorangegangenen Northern blot Analysen eine signifikante agonistische Wirkung.

Für eine therapeutische Anwendung von ZK97397 und ZK98298 als Antiprogestine mit reduzierter Antigluocorticoidwirkung ist es zweckmäßig, diese schwachen antigluocorticoiden Eigenschaften in zusätzlichen Systemen zu überprüfen. Dabei ist es von Vorteil, anstelle eines einzelnen Gens die Aktivität der Substanzen anhand eines biologischen Effekts zu untersuchen.

Eine bereits seit den 80er Jahren bekannte und mit einfachen Mitteln zu untersuchende Eigenschaft von Glucocorticoiden ist die Induktion der Apoptose in Thymuszellen.

5.2.3 Reduzierte antagonistische Wirkung von ZK97397 und ZK98298 gegenüber RU486 auf die Glucocorticoid-induzierte Apoptose

Die Behandlung von Thymuszellen mit Glucocorticoiden leitet ein Suizidprogramm ein, welches letztendlich zum Absterben der Zellen führt (Wyllie, 1980). Dieser Effekt wird als programmierter Zelltod oder als Apoptose bezeichnet (Ucker, 1987). Es handelt sich dabei um einen physiologischen Vorgang, bei dem einzelne Zellen planmäßig eliminiert werden. Der genaue Mechanismus, über den die Apoptose initiiert wird, ist unklar. Voraussetzung ist jedoch das Vorhandensein des Glucocorticoidrezeptors und eine hormonabhängige Regulation entsprechender Gene. Steroidhormonantagonisten, wie beispielsweise die beiden Substanzen ZK97397 und ZK98298 sollten aufgrund ihrer Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor ebenfalls in der Lage sein, die Apoptoserate in Thymocyten zu beeinflussen. Ein starkes Antigluocorticoid, z. B. RU486, sollte die Dexamethason-abhängige Apoptose reprimieren, wohingegen schwache Antigluocorticoidoide wie ZK97397 und ZK98298 einen geringeren Einfluß auf die Glucocorticoid-vermittelte Apoptose haben sollten.

Bei diesen Experimenten wurden jungen CB/6 Mäusen die Thymusdrüse entfernt. Die Organe wurden homogenisiert und die Thymuszellen in Kulturplatten (24-well) kultiviert. Ein Teil der Zellen wurden mit dem Agonist Dexamethason (10^{-8} M) oder den Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 (jeweils 10^{-7} M) behandelt. Parallel dazu wurden weitere Ansätze mit Dexamethason (10^{-8} M) in Kombination mit jeweils einem der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 (10^{-7} M) behandelt und für 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Farbstoff, Propidium Iodid, behandelt, der in der Lage ist DNA anzufärben. Intakte Membranen lebender Zellen machen jedoch eine Interaktion zwischen DNA und Farbstoff unmöglich, so daß lediglich DNA derjenigen Zellen angefärbt wird, die eine beschädigte Membran besitzen und deshalb tot sind. Die mit Propidium Iodid behandelten Zellen konnten nun in einem FACS-Analysegerät (fluorescence activated cell sorter) sortiert werden.

Mit Hilfe eines FACS-Gerätes ist es möglich, eine große Anzahl von Zellen zu erfassen und aufgrund ihres Verhaltens gegenüber Propidium Iodid zu analysieren. Dabei wurden im Analysegerät alle Zellen gezählt und nach ihrem unterschiedlichen Fluoreszenzverhalten, in lebende und tote Zellen getrennt und gleichzeitig die jeweilige Anzahl bestimmt.

Die Apoptoserate der Dexamethason-behandelten Zellen wurde in der Abbildung 9a und 9b auf 100 % gesetzt. Man erkennt in der Abbildung 9a, daß die Behandlung der Thymocyten mit den Antagonisten ZK97397 und ZK98298 alleine keinen signifikanten Einfluß auf die Apoptoserate der Thymocyten haben. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Erkenntnisse, wonach ZK97397 und ZK98298 keine agonistische Aktivität besitzen. Auch RU486 zeigt in diesem Experiment keine agonistische Wirkung.

Hingegen zeigt die Abbildung 9b deutliche Unterschiede zwischen dem starken Antigluocorticoide RU486 und den wesentlich schwächeren Antigluocorticoiden ZK97397 und ZK98298 bei der Repression der durch Dexamethason induzierten Apoptose. Während RU486, wie erwartet, die Dexamethason-induzierte Apoptose fast vollständig verhindert, sind die schwachen Antigluocorticoide nur zu 50 % im Falle von ZK97397 und bei ZK98298 sogar lediglich zu 30 % in der Lage, die Apoptose zu reprimieren.

Diese Resultate machen deutlich, daß die beiden Antagonisten ZK97397 und ZK98298 nicht nur an definierten Promotoren wie dem LTR MMTV Promotor, sondern darüber hinaus auch in komplexeren biologischen Systemen wie der Dexamethason-induzierten Apoptose, als schwache Antigluocorticoide nur zu einem gewissen Grad in der Lage sind, die Wirkung von Dexamethason zu antagonisieren. Dagegen hemmt ein starker Glucocorticoid-antagonist wie RU486 die Dexamethasonwirkung sowohl in einfachen als auch komplexen Systemen fast vollständig.

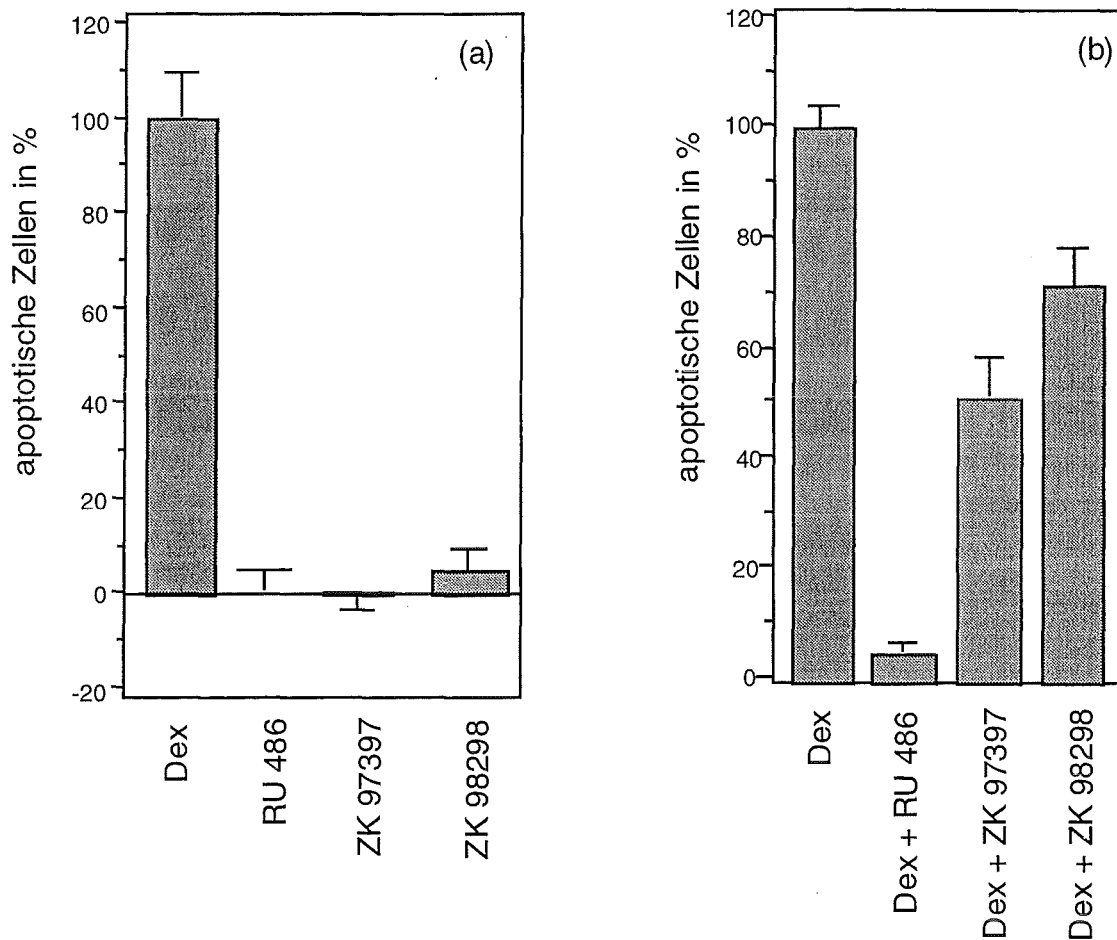


Abb. 9a,b Wirkung von Dexamethason, ZK97397, ZK98298 und RU486 auf die Apoptose von Maus-Thymuszellen. Maus-Thymuszellen wurden aus 4-6 Wochen alten CB/6 Mäusen isoliert. Das Thymusgewebe wurde entnommen, homogenisiert und durch Nylogewebe filtriert. Die Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % Serum kultiviert und 48 Stunden mit den angegebenen Hormonen behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Propidium Iodid gefärbt. Im FACS-Analysegerät (fluorescence activated cell sorter) wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen bestimmt. In (a) wurden die Zellen mit den Hormonen (10^{-7} M) alleine, in (b) mit einer Kombination aus Dexamethason (10^{-8} M) und den angegebenen Antagonisten (10^{-7} M) behandelt. Die Dexamethason-induzierte Apoptoserate wurde auf 100 % gesetzt, die Apoptoserate ohne Hormonbehandlung betrug 0 %. Negative Werte oder Werte über 100 % (Fehlerbalken) kommen dadurch zustande, daß ein Teil der Zellen auch ohne Hormonbehandlung stirbt.

Für eine mögliche therapeutische Anwendung von Progesteronantagonisten über einen längeren Zeitraum, z. B. zur Behandlung von Tumoren, sollten solche Verbindungen möglichst wenig Nebenwirkungen aufweisen. Deshalb sind Substanzen mit geringen antiglucoocorticoide Eigenschaften erstrebenswert. Aufgrund ihrer chemischen Struktur können diese Antagonisten aber auch mit weiteren Steroidhormonrezeptoren, wie z. B. dem

Androgenrezeptor interagieren. Eine Interaktion mit dem Mineralocorticoidrezeptor und dem Östrogenrezeptor konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

5.3 Die agonistische Wirkung der Progesteronantagonisten ZK97397 und ZK98298 bezüglich des Androgenrezeptors

Untersuchungen mit Antigestagenen, die eine möglicherweise reduzierte Antigluco-corticoidwirkung besitzen, haben zu zwei Verbindungen geführt, die diesen Eigenschaften entsprechen (RU46556 und RU49295). Jedoch haben Philibert und Mitarbeiter (1991) gezeigt, daß diese Substanzen mit dem Androgenrezeptor wechselwirken und dabei starke androgene Wirkung besitzen.

Um nachzuprüfen, ob sich die Substanzen ZK97397 und ZK98298 ähnlich verhalten, wurde ihre agonistische Wirkung bezüglich des Androgenrezeptors in Transfektions-experimenten in CV 1-Zellen untersucht.

Neben dem Reporter-Plasmid ARE₂ TATA CAT wurde ein Expressionsvektor, der den menschlichen Androgenrezeptor enthält, kotransfiziert. Bei dem Reporterplasmid handelt es sich um ein einfaches Plasmidkonstrukt, welches vor dem CAT-Gen zwei Bindestellen für den Androgenrezeptor (ARE₂) und einem Minimalpromotor besitzt.

Nach der Kotransfektion der Zellen wurden zwei der Ansätze mit 10⁻⁸ M und 10⁻⁷ M des synthetischen Androgens Miboleron behandelt. Weitere Ansätze wurden mit jeweils 10⁻⁸, 10⁻⁷ und 10⁻⁶ M der Progesteronantagonisten ZK97397, ZK98298 oder RU486 behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und die CAT-Aktivität bestimmt.

Abb. 10 zeigt, daß die Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486, zumindest teilweise, die Expression des CAT-Gens durch den Androgenrezeptor regulieren.

Die Behandlung der Zellen mit Miboleron bewirkt eine konzentrationsabhängige Induktion des CAT-Gens. ZK97397, aber auch RU486, erhöhen ebenfalls die Expression des CAT-Gens. Beide Substanzen sind jedoch schwächer androgen wirksam als der eigentliche Agonist Miboleron.

Die schwächste Androgen-agonistische Wirkung in dieser Untersuchung besitzt ZK98298. Die Androgenaktivität der Substanzen ZK97397, ZK98298 und RU486 entspricht ihrer Antigluco-corticoidwirkung, d. h. je schwächer ihre Antigluco-corticoidwirkung, desto schwächer auch ihre Androgenaktivität. Diese Tatsache könnte möglicherweise bei der Substanz ZK98298 auf eine reduzierte Affinität zum Androgenrezeptor zurückgeführt werden.

Diese Untersuchungen machen deutlich, daß die Antihormone ZK97397, ZK98298 und RU486 ebenfalls mit dem Androgenrezeptor interagieren. Während RU486 und ZK97397 vergleichbare Aktivitäten besitzen, ist die Aktivität von ZK98298 deutlich reduziert.

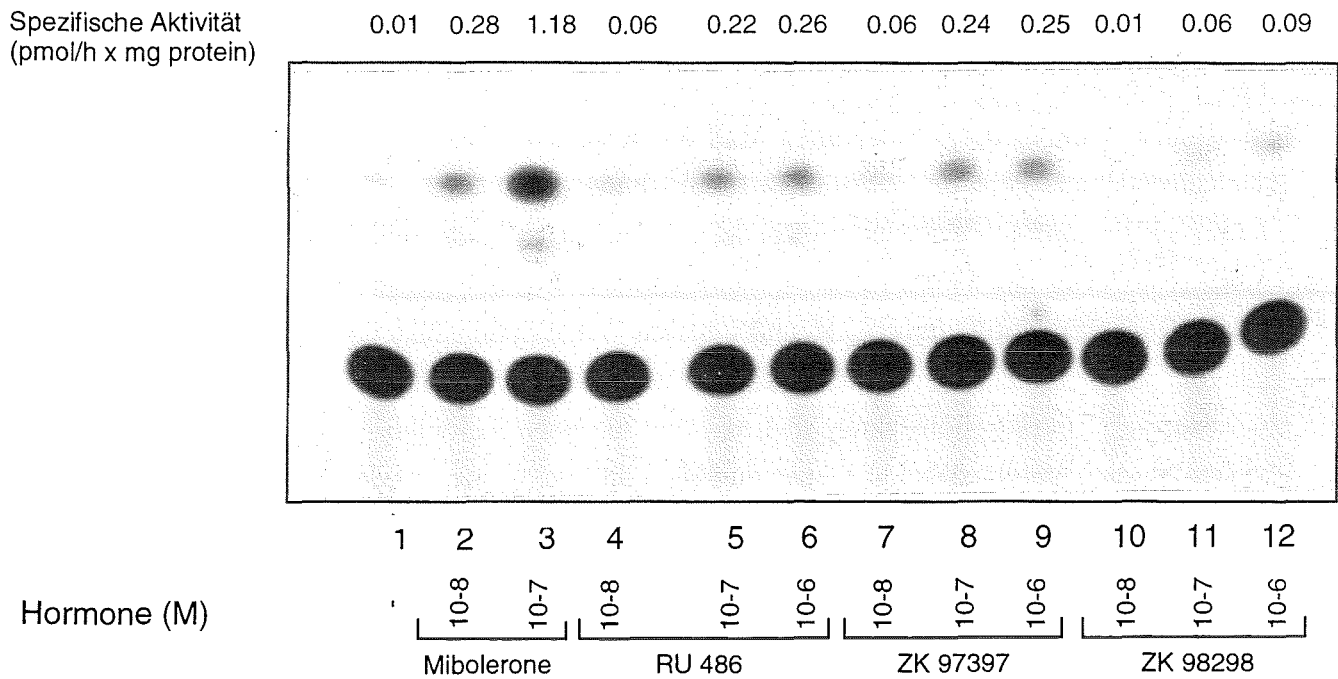


Abb. 10 CAT-Assay zur agonistischen Wirkung der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486 durch den Androgenrezeptor.

Nach Kofransfektion der Zellen mit dem Androgenrezeptor und einem ARE₂ TATA CAT-Konstrukt wurden zwei der Ansätze mit 10^{-8} und 10^{-7} M Miboleron behandelt. Weitere Ansätze wurden mit jeweils 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} M ZK97397, ZK98298 und RU486 behandelt. Zwei Tage danach wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und die CAT-Aktivität bestimmt und autoradiographisch ausgewertet. Die Abbildung zeigt die agonistische Wirkung sowohl von Miboleron als auch der Antagonisten ZK97397, ZK98298 und RU486. Die Zahlen über der Abbildung geben die spezifische Aktivität in pmol/h x mg Protein an.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Substanz ZK97397 aufgrund ihrer deutlich stärkeren Antigestagenwirkung gegenüber ZK98298 einen wesentlichen Vorteil besitzt. In ihrer antigestagenen und Androgen-agonistischen Wirkung ist sie vergleichbar mit RU486, besitzt aber weit weniger Antigluocorticoidwirkung als diese.

6. Repression von Genen durch Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind in der Lage, die Transkription hormonregulierter Gene sowohl zu induzieren als auch zu reprimieren. Während der Mechanismus der Induktion von Genen durch Steroidhormone weitgehend bekannt ist, ist die Repression hormonregulierter Gene weit weniger verstanden. Das liegt zum einen daran, daß bisher nur wenige Gene untersucht wurden, die einer negativen Regulation durch Steroidhormone unterliegen. Zum anderen aber auch, daß die Repression von Genen verschiedenen Mechanismen unterliegt, die sich zum Teil deutlich unterscheiden. So findet man neben der Genrepression auf DNA-Rezeptor Ebene, z.B. negative Hormonrezeptorbindestellen (nHRE), auch direkte Protein-Protein Interaktionen, wie beispielsweise die Wechselwirkung zwischen Hormonrezeptoren und weiteren Transkriptionsfaktoren.

Eines der am besten untersuchten Beispiele der negativen Genregulation ist die Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor AP-1 und verschiedenen Steroidhormonrezeptoren. Die meisten Studien wurden dabei an Genen durchgeführt, die für verschiedene Matrixmetalloproteinasen kodieren, wie beispielsweise Collagenasen und Stromelysine.

6.1 Regulation der Expression des menschlichen Collagenase 1-Promotors durch verschiedene Progesteronantagonisten

Progesteronantagonisten können die Transaktivierung von Genen sowohl durch den Progesteron- als auch den Glucocorticoidrezeptor hemmen. Die vorangehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß die beiden Substanzen ZK97397 und ZK98298 in der Lage sind, die Genaktivierung durch den Progesteronrezeptor zu reprimieren, gleichzeitig besitzen sie jedoch nur geringe Antiglucocorticoidwirkung. In den folgenden Experimenten sollten nun die Substanzen ZK97397 und ZK98298 sowie weitere Progesteronantagonisten daraufhin untersucht werden, in wieweit sie die Genrepression durch den Progesteronrezeptor antagonisieren.

Dazu wurden Transfektionsexperimente in CV 1-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden transient mit dem Progesteronrezeptor (B-Form) und einem Genkonstrukt kotransfiziert, bei dem die Sequenz -517 bis +63 des Collagenase 1-Promotors die Expression der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reportergen kontrolliert. Dieses Genkonstrukt besitzt Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-1, jedoch keine Bindestellen für den Progesteronrezeptor.

Um eine mögliche Repression der Antigestagene auf die Expression des Collagenase 1-Gens zu untersuchen, wurde das Gen mit TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) induziert. Gleichzeitig wurden die verschiedenen Ansätze mit R5020 (10^{-9} M) und jeweils

einem der Antagonisten (10^{-7} M) behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität bestimmt.

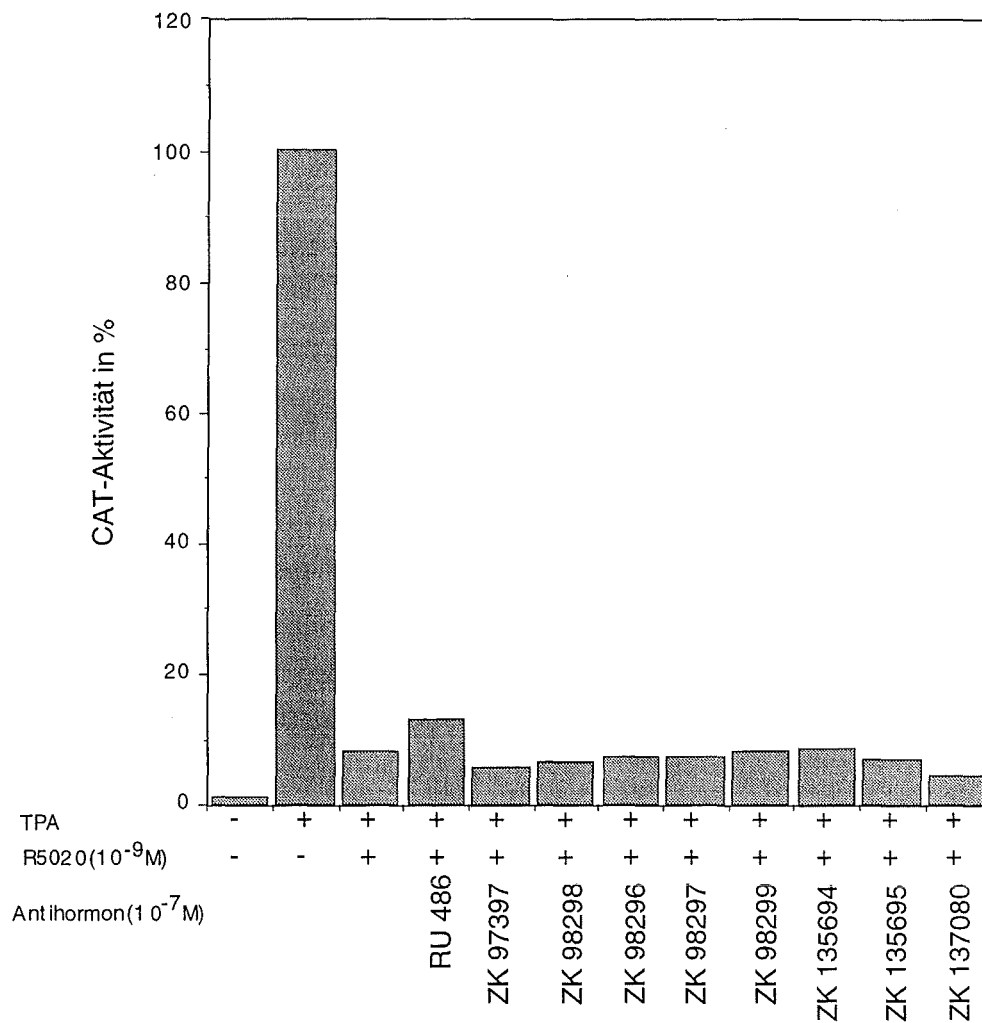


Abb. 11 Repression der TPA-Wirkung durch verschiedene Progesteronantagonisten in CV 1-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Progesteronrezeptor (B-Form) und einem Collagenase-CAT-Konstrukt kotransfiziert. Sechs Stunden danach wurden die Zellen mit TPA (80 ng/ml) sowie R5020 (10^{-9} M) und den Antiprogestinen (10^{-7} M) behandelt. Die Zellen wurden geerntet und die CAT-Aktivität bestimmt. Dabei wurde die Induktion der Collagenase-Expression durch TPA auf 100 % (= 425000 cpm) gesetzt. Alle weiteren Werte wurden entsprechend berechnet. Das Diagramm zeigt ein charakteristisches Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Induktion ist durch den synthetischen Agonisten R5020 vollständig reprimierbar. Die zusätzliche Verabreichung der Progesteronantagonisten führt nicht zu einer Hemmung der R5020 Wirkung. D. h. keiner der Antagonisten ist in der Lage, die Wirkung des Agonisten R5020 zu antagonisieren, obwohl sie in einer 100-fach höheren Konzentration zugegeben wurden.

Aus dem vorangegangenen Experiment wurde deutlich, daß die Progesteronantagonisten die durch R5020 bewirkte Hemmung der AP-1 Aktivität nicht aufheben. Dies hat möglicherweise zwei Gründe: Es ist denkbar, daß die Progesteronantagonisten in diesem System (Collagenase 1-Promotor in CV 1-Zellen) keine Negativwirkung besitzen oder aber sie besitzen ähnliche Wirkung wie der Agonist R5020.

Um das Verhalten der Antagonisten bezüglich des Collagenase 1-Promotors zu klären, wurde die Wirkung der Progesteronantagonisten auf die AP-1 Aktivität alleine untersucht. Dazu wurde das Collagenase-CAT-Konstrukt zusammen mit dem Progesteronrezeptor in CV 1-Zellen kotransfiziert. Die AP-1 abhängige CAT-Expression wurde durch die Behandlung der Zellen mit TPA induziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit R5020 oder einem der Progesteronantagonisten behandelt.

Zwei Tage nach Verabreichung von TPA und den Hormonen wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und ein CAT-Assay durchgeführt. In Abbildung 12 ist in einem Balkendiagramm ein Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Wie zu erwarten, ließ sich bei diesen Untersuchungen die Expression des Collagenase-CAT-Konstrukts durch TPA induzieren. Diese Induktion wird durch den Agonisten R5020 nahezu vollständig reprimiert.

Alle Antagonisten zeigen in diesem Experiment ebenfalls agonistische Wirkung, da sie die durch TPA induzierte Expression des Collagenasegens hemmen. Die Repression der TPA-Induktion durch die verschiedenen Hormonantagonisten variiert in einem engen Bereich zwischen 80 und 90 %, lediglich die Substanz ZK135694 reprimiert zu ca. 65 %. Auch die beiden Substanzen ZK97397 und ZK98298 zeigen eine agonistische Aktivität.

Aufgrund der Untersuchungen am Collagenase 1-Promotor in CV 1-Zellen wurde deutlich, daß ZK97397 und ZK98298 die Collagenase 1-Expression genauso gut hemmen wie R5020 oder die anderen Progesteronantagonisten. Darüber hinaus ist keiner der Progesteronantagonisten in der Lage, die AP-1 hemmende Wirkung von R5020 zu antagonisieren. Dieses Ergebnis war unerwartet, da in klinischen Studien ein antagonistsicher Effekt von RU486 auf die Progesteronwirkung im Uterus gezeigt werden konnte (Bygdeman *et al.*, 1994). Möglicherweise sind CV 1-Zellen oder aber der Collagenase 1-Promotor für diese Untersuchungen ungeeignet. Deshalb sollten weitere Untersuchungen direkt in einem Tiermodell (*in vivo*) durchgeführt werden.

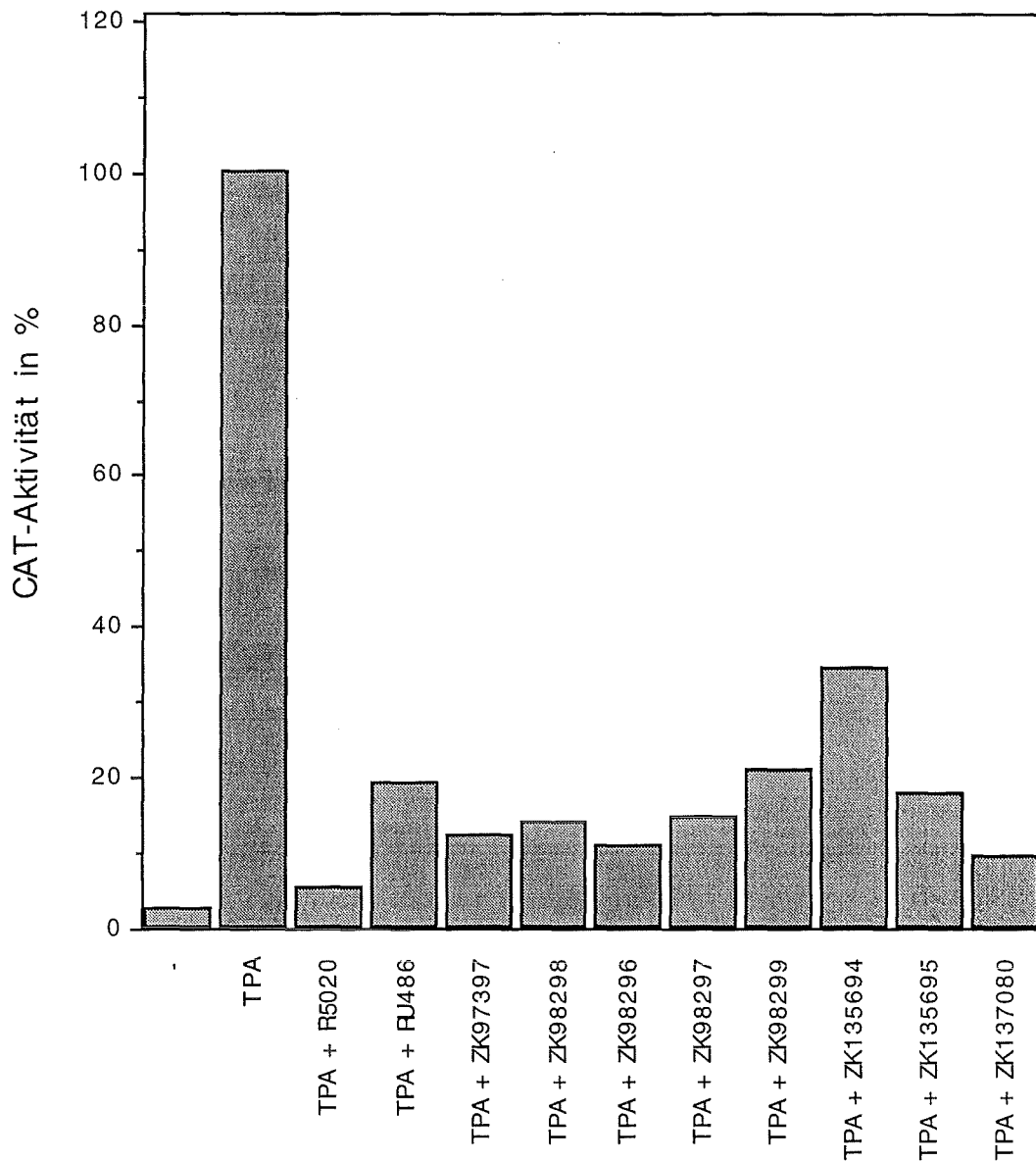


Abb. 12 Auswertung eines CAT-Assays in CV 1-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Plasmid für den Progesteronrezeptor und einem Collagenase-CAT-Konstrukt kotransfiziert und gleichzeitig mit TPA (80 ng/ml) sowie den angegebenen Hormonen (R5020: 10^{-8} M; Progesteronantagonisten: 10^{-7} M) behandelt. Die Zellen wurden geerntet, ein Gesamtproteinextrakt präpariert und ein CAT-Assay durchgeführt. Die durch TPA induzierte CAT-Aktivität wurde 100 % (=458000 cpm) gesetzt, alle weiteren Werte wurden entsprechend berechnet. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

6.2 Regulation von Matrixmetalloproteinasen durch Progesteronantagonisten *in vivo*

Um den Einfluß von Progesteronantagonisten auf die Regulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen im Endometrium zu untersuchen, wurde ein Kaninchenmodell herangezogen. Diese Experimente waren auf die Untersuchung des Progesteronantagonisten ZK98299 beschränkt. Es war nicht möglich, noch andere in dieser Arbeit vorgestellten Progesteronantagonisten im Tier zu untersuchen.

Matrixmetalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Degradation von Gewebe des Endometriums am Ende des Menstruationszyklus. Bei einer Befruchtung der Eizelle wird der Abbau der Uterusschleimhaut durch einen hohen Progesteronspiegel verhindert. Hingegen führt die Verabreichung von Antiprogestinen, z. B. RU486, zur Degradation der Schleimhaut (Bydeman *et al.*, 1994)

Für diese Studien wurden pseudoschwangere Kaninchen verwendet. Um den Zustand der Scheinschwangerschaft herbeizuführen, wurden die Tiere mit dem Hormon HCG (human chorionic gonadotropin) behandelt. Anschließend erhielten einige der Tiere 20 mg des Antihormons ZK98299 pro kg Körpergewicht, zum Teil an bis zu drei aufeinanderfolgenden Tagen (siehe Abb. 13). Jeweils einer Kontrollgruppe wurde nur Sesamöl (als Vehikel für den Hormonantagonisten) verabreicht. Die Tiere wurden getötet, der Uterus entnommen und die zum Lumen hin gelegenen Gewebepartien ausgeschabt. Aus den Gewebeextrakten wurde die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen.

Diese Membran wurde mit einer Auswahl verschiedener Sonden für Matrixmetalloproteinasen hybridisiert, dabei handelte es sich um Sonden gegen

| | |
|-----------------------------|----------|
| *menschliche Collagenase I | (MMP 1) |
| *menschliche Collagenase IV | (MMP 2) |
| *menschliches Stromelysin I | (MMP 3) |
| *Maus-Stromelysin II | (MMP 10) |
| *menschliches Matrilysin | (MMP 7) |

sowie eine Sonde, gegen einen Inhibitor einiger Matrixmetalloproteinasen,

*Maus-TIMP I

Sowohl die menschlichen als auch die Maus-Sonden waren ausreichend homolog, um mit der Kaninchen-RNA zu hybridisieren.

Die Experimente zeigten, daß nur die Sonde gegen Matrilysin (MMP 7) mit der Kaninchen-RNA hybridisierte. Die Sonden gegen die verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMP 1, 2, 3, 10) und die Sonde gegen den Inhibitor, TIMP I, zeigten hingegen keine

Hybridisierung. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Rodgers *et al.*, 1994), wonach Matrilysin die einzige Metalloproteinase ist, die in Epithelzellen des Endometriums exprimiert wird.

Darüberhinaus erkennt man in Abb. 13, daß nur diejenigen Tiere Matrilysin exprimieren, denen drei Tage lang (Spur 10) das Antihormon ZK98299 verabreicht wurde. Bei Kaninchen die lediglich an einem Tag (Spur 6 und 8) eine entsprechende Dosis ZK98299 erhielten, ist noch keine Expression von Matrilysin nachweisbar.

Der Filter wurde anschließend mit einer Uteroglobinsonde hybridisiert. Uteroglobin ist ein durch Progesteron induziertes Protein, welches bei Kaninchen in der ersten Schwangerschaftswoche den Hauptbestandteil des Uterussekrets ausmacht (Krusche und Beier, 1994). Die Abbildung 13 zeigt, daß in den ersten Tagen der Scheinschwangerschaft die Expression des Uteroglobingens zunimmt (Spuren 1-5) (in Spur 5 wurde etwas weniger RNA aufgetragen, deshalb ist das Uteroglobinsignal schwächer als in Spur 4). Durch die Behandlung der Tiere mit dem Antihormon ZK98299 wird die Expression der Uteroglobin-mRNA deutlich reprimiert (Spuren 6, 8 und 10). Hingegen findet man in den Kontrolltieren keine Repression der Uteroglobin-mRNA (7, 9 und 11). Dieses Experiment verdeutlicht die negative Wirkung des Antihormons ZK98299 auf die progesteronabhängige Expression des Uteroglobingens.

Die hier durchgeführten Experimente zeigen, daß es sich bei Matrilysin um ein Gen handelt, welches während der Schwangerschaft normalerweise nicht exprimiert wird. Die Behandlung der Tiere mit dem Progesteronantagonisten ZK98299 an drei aufeinanderfolgenden Tagen bewirkt eine signifikant erhöhte Expression dieses Gens. Hingegen wird die Expression von Uteroglobin durch die Progesteron-antagonistische Wirkung von ZK98299 deutlich reprimiert. Bei der Induktion des Matrilysingens durch ZK98299 handelt es sich demnach um eine neue Eigenschaft dieses Antigestagens.

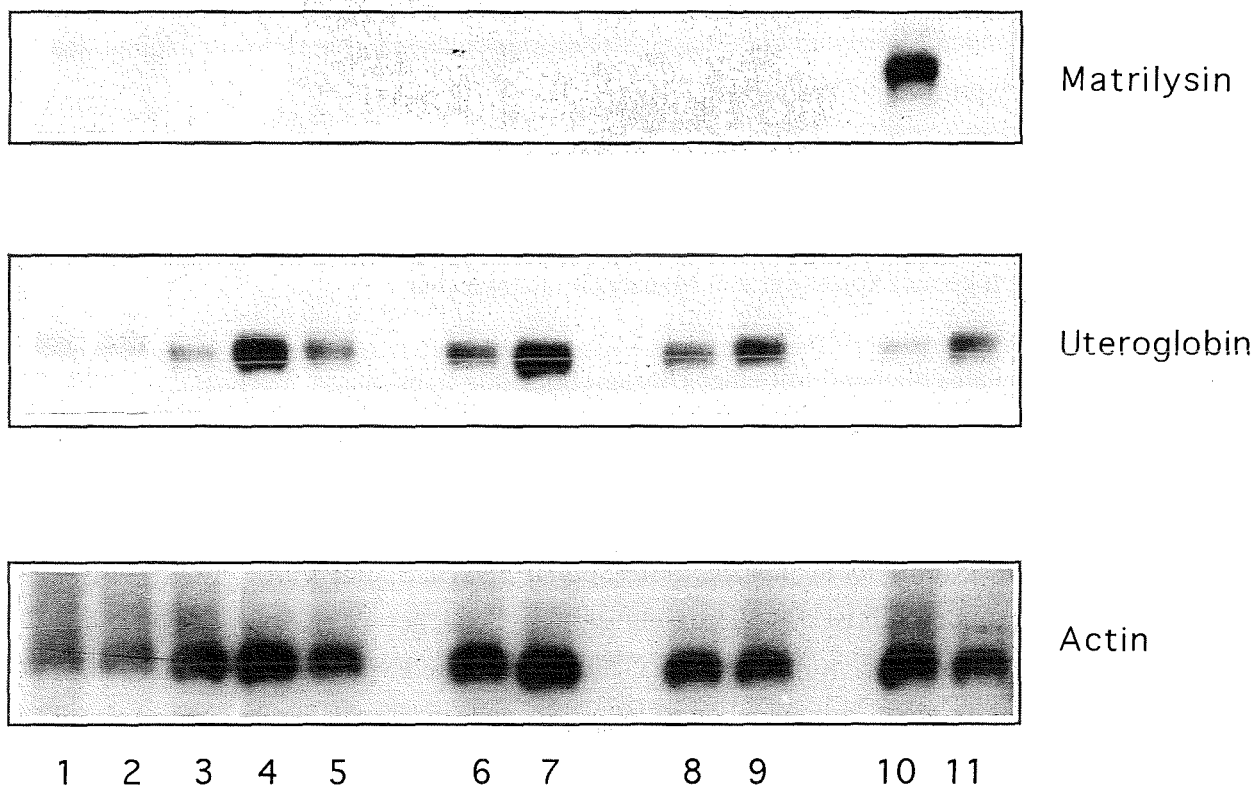


Abb. 13 Northern blot Analyse von endometrialer Kaninchen-RNA. Pseudogravide Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und unterschiedlich lange mit dem Progesteronantagonisten ZK98299 (20 mg/kg) behandelt. Anschließend wurden die Tiere getötet und Gesamt-RNA aus dem Endometrium präpariert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Membran nacheinander mit einer α -Actin-, mit einer Uteroglobin- und einer Matrilysinsonde hybridisiert. Die Filter wurden freundlicherweise von Frau Claudia Krusche aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Beier, Aachen zur Verfügung gestellt.

Spur 1: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG behandelt und am Tag 0 getötet

Spur 2: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG behandelt und am Tag 1 getötet

Spur 3: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG behandelt und am Tag 2 getötet

Spur 4: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG behandelt und am Tag 3 getötet

Spur 5: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG behandelt und am Tag 5 getötet

Spur 6: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, am Tag 2 mit ZK98299 behandelt und am Tag 3 getötet

Spur 7: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, am Tag 2 mit Vehikel behandelt und am Tag 3 getötet

Spur 8: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, am Tag 4 mit ZK98299 behandelt und am Tag 5 getötet

Spur 9: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, am Tag 4 mit Vehikel behandelt und am Tag 5 getötet

Spur 10: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, an den Tagen 2, 3, 4 mit ZK98299 behandelt und am Tag 5 getötet

Spur 11: Tiere wurden am Tag 0 mit HCG, an den Tagen 2, 3, 4 mit Vehikel behandelt und am Tag 5 getötet

6.3 *In vitro* System für die Regulation der Expression des Matrilysingens

6.3.1 Nachweis der Expression des Matrilysingens in Zellkultur

Matrilysin ist aufgrund seiner Regulation durch den Antagonisten ZK98299 ein geeignetes Gen, um den möglichen Wirkungsmechanismus von Antigestagenen zu untersuchen. Zur Durchführung geeigneter Untersuchungen, ist ein Zellkultursystem von Vorteil. Da ein stabiles Zellkultursystem aus Kaninchenendometrium nicht zur Verfügung stand, wurden verschiedene humane Zelllinien daraufhin getestet, in wieweit sie das Gen für Matrilysin exprimieren.

Verschiedene Zelllinien des Endometriums (Ishikawa, KLE und EFE-184) sowie, als Kontrolle, eine Zelle aus dem Uterus (HeLa) und aus der Brustdrüse (T47D) wurden, zur Induktion des Matrilysingens, für vier Stunden mit TPA behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und aus den Extrakten polyA⁺RNA isoliert. Die RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Mittels zweier spezifischer Primer und der transkribierten cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt.

Mit den Primern P1: 5'-CCAGATGTGGAGTGCCAGATGTTGC-3' und P2: 5'-GACATTCAAAAACCAACTGC-3' sollte aus den verschiedenen cDNAs ein Fragment von 689 bp Länge im Bereich zwischen den Basen +254 und +943 der Matrilysin-cDNA in der PCR amplifiziert werden. Die Amplifikation eines entsprechenden Fragments gelang ausschließlich in der endometrialen Zelllinie EFE-184. Aus der cDNA der anderen Zelllinien konnte kein entsprechendes Fragment amplifiziert werden (Abb. 14).

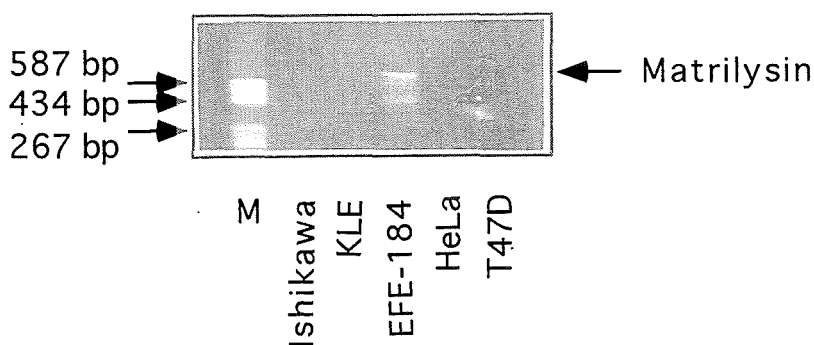


Abb. 14 RT-PCR Analyse verschiedener humaner Zelllinien. Die angegebenen Zelllinien wurden vier Stunden mit TPA (80ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die polyA⁺RNA isoliert. Die RNA wurde mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert und mit Matrilysin-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Die Reaktionsansätze wurden im Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Links außen sind die Größen dreier Fragmente des Größenstandards (M) angegeben.

Das Fragment wurde isoliert und in den Vektor pCR™ kloniert. Die Sequenzierung des Fragments bestätigte die Übereinstimmung mit der bereits bekannten Sequenz des menschlichen Matrilysingens (Abb. 15).

```

1  ATGCGACTCA CCGTGCTGTG TGCTGTGTGC CTGCTGCCTG GCAGCCTGGC
51  CCTGCCGCTG CCTCAGGAGG CGGGAGGCAT GAGTGAGCTA CAGTGGGAAC
101 AGGCTCAGGA CTATCTCAAG AGATTTTATC TCTATGACTC AGAAACAAAA
151 AATGCCAACA GTTTAGAAAGC CAAACTCAAG GAGATGCAAA AATTCTTTGG
201 CCTACCTATA ACTGGAATGT TAAACTCCCA CGTCATAGAA ATAATGCAGA
      P1
251  AGCCCAGATG TGGAGTGCCA GATGTTGCAG AATACTCACT ATTTCCAAAAT
301  AGCCCAAAAT GGACTTCCAA AGTGGTCACC TACAGGATCG TATCATATAC
351  TCGAGACTTA CCGCATATTA CAGTGGATCG ATTAGTGTCA AAGGCTTTAA
401  ACATGTGGGG CAAAGAGATC CCCCTGCATT TCAGGAAAAGT TGTATGGGGA
451  ACTGCTGACA TCATGATTGG CTTTGC GCGA GGAGCTCATG GGGACTCCTA
501  CCCATTTGAT GGGCCAGGAA ACACGCTGGC TCATGCCTTT GCGCCTGGGA
551  CAGGTCTCGG AGGAGATGCT CACTTCGATG AGGATGAACG CTGGACGGAT
601  GGTAGCAGTC TAGGGATTAA CTTCTGTAT GCTGCAACTC ATGAACTTGG
651  CCATTCTTTG GGTATGGGAC ATTCCTCTGA TCCTAATGCA GTGATGTATC
701  CAACCTATGG AAATGGAGAT CCCCAAAAT TTAAACTTTC CCAGGATGAT
751  ATTAAAGGCA TTCAGAAACT ATATGGAAAAG AGAAGTAATT CAAGAAAAGAA
801  ATAGAAACTT CAGGCAGAAC ATCCATTCAT TCATTCATTG GATTGTATAT
851  CATTGTTGCA CAATCAGAAT TGATAAGCAC TGTTCCTCCA CTCCATTTAG
901  CAATTATGTC ACCCTTTTTT ATTGCAGTTG GTTTTTGAAT GTCTTTCACT
      P2
951  CCTTTTTTGG TTAAACTCCT TTATGGTGTG ACTGTGTCTT ATTCCATCTA
1001 TGAGCTTTGT CAGTGCGCGC AATAAATGTT ACATACACAA ATAAATAAAA
1051 TGTTTATTCC ATGGTAAATT TAT

```

Abb. 15 cDNA-Sequenz des menschlichen Matrilysingens. Zum Nachweis der Expression des Matrilysingens in der RT-PCR Analyse wurden in EFE-184-Zellen mit dem angegebenen Primerpaar (P1 und P2) ein 689 bp großes Matrilysinfragment amplifiziert. Dieses Fragment wurde kloniert und sequenziert. Das sequenzierte Fragment stimmte mit der Sequenz des humanen Matrilysingens überein.

Dieses Fragment wurde anschließend radioaktiv markiert und als Sonde für eine Northern blot Analyse verwendet. Dieses Experiment bestätigte, daß das Matrilysingen nur in EFE-184-Zellen exprimiert wird.

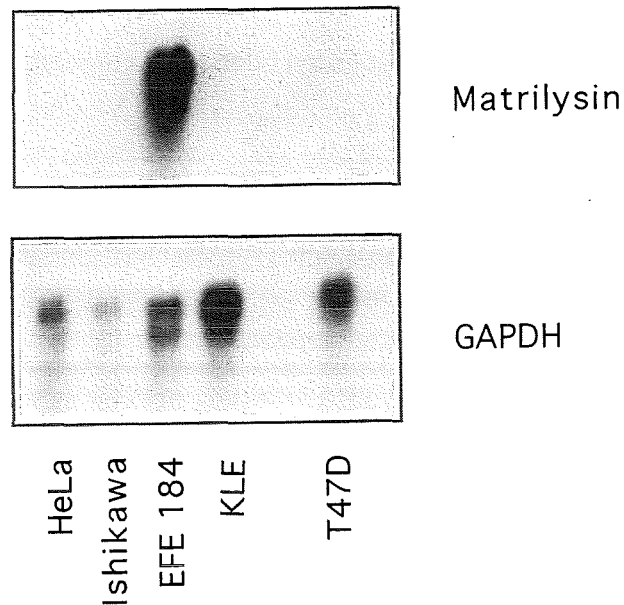


Abb. 16 Northern blot Analyse verschiedener Zelllinien. Die angegebenen Zelllinien wurden vier Stunden mit TPA (80 ng/ml) behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet, polyA⁺RNA isoliert, diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes Matrilysin-Fragment verwendet, welches durch RT-PCR-Amplifikation aus EFE -184-Zellen isoliert wurde.

Da EFE-184-Zellen das Matrilysingen exprimieren, ist gewährleistet, daß sie alle für die Expression notwendigen Faktoren enthalten. Aus diesem Grund sind die Zellen dazu geeignet, den Mechanismus der Regulation des Matrilysingens durch Progesteronantagonisten näher zu untersuchen. Da diese Zellen keinen Progesteronrezeptor exprimieren, wurden sie mit einem Progesteronrezeptor-Konstrukt transfiziert.

6.3.2 Wirkung verschiedener Hormonantagonisten auf den Matrilysin-promotor in EFE-184-Zellen

Um die Expression des Matrilysingens durch Antiprogestine zu untersuchen, wurden EFE-184-Zellen transient mit dem Progesteronrezeptor und einem Promotor-CAT-Konstrukt kotransfiziert. Dieses Promotorkonstrukt (p-933 HPCAT) enthält vor dem CAT-Gen Sequenzen des menschlichen Matrilysin-Promotors von -933bp bis +35bp. Dieser Bereich umfaßt neben der TATA-box eine AP-1 Bindestelle und ein GRE (Matrisian *et al.*, 1994) sowie mehrere PEA3 Bindestellen und TGF- β 1 Inhibitorelemente (Gaire *et al.*, 1994).

Sechs Stunden nach der Transfektion der Zellen wurden diese mit TPA, dem Agonisten R5020 und den verschiedenen Progesteronantagonisten behandelt. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte präpariert und ein CAT-Assay durchgeführt. Die Abbildung 17 zeigt das Balkendiagramm eines charakteristischen Experiments.

Die Behandlung der Zellen mit dem Agonisten oder den Antagonisten alleine führten nicht zu einer erhöhten Expression des Matrilysinpromotors. Die Verabreichung von TPA alleine zeigte ebenfalls keinen Effekt, im Gegensatz zur stark erhöhten Expression in Gegenwart von TPA bei der Northern blot Analyse. Die AP-1 Bindestelle wird für die Induktion verschiedener Matrixmetalloproteinasen durch TPA oder verschiedene Wachstumsfaktoren benötigt, jedoch ist sie in vielen Fällen für die volle Aktivität nicht ausreichend (Gaire *et al.*, 1994). Möglicherweise fehlen bestimmte DNA-Sequenzen in dem hier verwendeten Promotorkonstrukt, die jedoch für die TPA-Wirkung notwendig sind. Werden die Zellen gleichzeitig mit TPA und R5020 oder einem der Antagonisten behandelt, so wird die Genexpression induziert. Diese Induktion beruht möglicherweise auf einer synergistischen Wirkung zwischen TPA und Hormon oder TPA und den Progesteronantagonisten. Werden TPA + R5020 + Antihormon zusammen verabreicht, sind zwei unterschiedliche Wirkungen erkennbar: Zum einen eine schwache Repression des CAT-Gens bei den Antagonisten RU486 und ZK97397, zum anderen eine signifikante Expression des Matrilysingens durch die Antagonisten ZK98298 und ZK98299. Die starke Induktion des Matrilysingens durch ZK98299 stimmt mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Untersuchungen an Kaninchen überein, bei denen ZK98299 die Expression des Matrilysingens induziert hat. Obwohl es sich hierbei um zwei unterschiedliche Systeme handelt (Mensch und Kaninchen), bleibt die starke Aktivierung des Gens durch ZK98299 erhalten.

Die Substanzen, die im ersten Teil dieser Arbeit als potente Progesteronantagonisten mit verminderter Antigluocorticoidwirkung identifiziert wurden (ZK97397 und ZK98298), verhalten sich bezüglich ihrer Fähigkeit, die Aktivierung von Matrylysin zu induzieren, unterschiedlich. Während ZK98298 die Genexpression stark induziert, zeigt ZK97397 keine Wirkung auf die Expression des Matrilysingens.

Diese Untersuchungen belegen eine erhöhte Expression des Matrilysingens nach einer Behandlung von Zellen mit den beiden Progesteronantagonisten ZK98298 und ZK98299. Die Regulation der Expression bestimmter Gene durch Progesteronantagonisten wurde als eine der Möglichkeiten für die tumorinhibierende Wirkung dieser Substanzen bereits beschrieben (Michna *et al.*, 1992). Um herauszufinden, in wieweit die Regulation weiterer Gene direkt durch Antigestagene kontrolliert wird, sollten mit Hilfe des "differential display" Gene identifiziert werden, die nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Progesteronantagonisten, gegenüber unbehandelten oder mit R5020 behandelten Zellen, verstärkt exprimiert oder reprimiert werden.

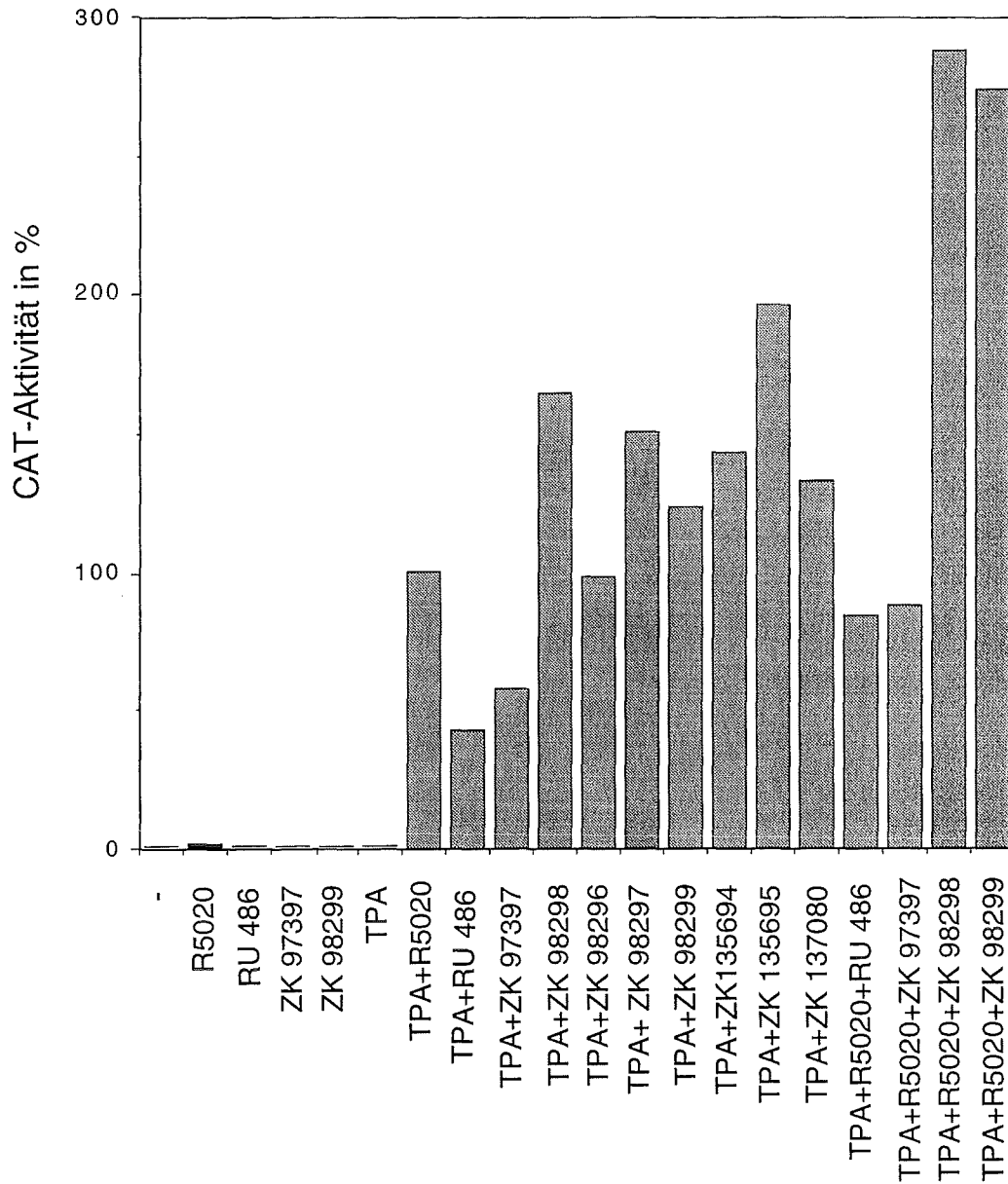


Abb. 17 EFE-184-Zellen wurden mit dem Progesteronrezeptor und einem Matrilysinpromotor-CAT-Konstrukt kotransfiziert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Hormonen (R5020, 10^{-8} M; Antihormone, 10^{-7} M) oder einer Kombination von TPA (80 ng/ml) und Hormonen behandelt. Die Zellen wurden geerntet und ein CAT-Assay durchgeführt. Die Kombination aus TPA + R5020 wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte entsprechend berechnet.

7. Auf der Suche nach antihormonregulierten Genen

Aus den vorausgegangenen Kapiteln wurde deutlich, daß Antiprogesterine die Expression von Genen auf unterschiedliche Weise beeinflussen können. So findet man Antiprogesterine mit reduzierter Antigluocorticoidwirkung und solche, die die Expression bestimmter Gene verstärken. Mit der Methode des "differential cDNA display" sollte versucht werden, weitere Gene zu identifizieren, welche auf transkriptioneller Ebene durch Antiprogesterine, insbesondere ZK97397 und ZK98298, reguliert werden und deren Expression oder Repression eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum Rezeptor-positiver Tumore besitzt.

In den zurückliegenden Jahren wurden verschiedene cDNA Klonierungstechniken wie beispielsweise "differential screening" oder "subtraktive Hybridisierung" dazu benutzt, um steroidhormonregulierte Gene zu identifizieren (Baughman *et al.*, 1991; Briehl *et al.*, 1990). In dieser Arbeit wurde jedoch die Technik des "differential display" (Liang und Pardee, 1992) verwendet, welche gegenüber der zuvor genannten Techniken zwei entscheidende Vorteile aufweist: Zum ersten ist es mit dieser Technik möglich, gleichzeitig mehrere RNAs einer Zelllinie zu untersuchen, die mit unterschiedlichen Hormonen behandelt wurden (bei der subtraktiven Hybridisierung können maximal zwei verschiedene RNA-Populationen miteinander verglichen werden), zum anderen können nicht nur Gene identifiziert werden, die vermehrt exprimiert, sondern auch solche, die durch die Hormonbehandlung gegebenenfalls reprimiert werden.

Beim "differential display" wird Gesamt-RNA aus verschiedenen Populationen von Zellen isoliert und mit dem Enzym Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA überschrieben. Die Zellen wurden zuvor mit verschiedenen Hormonen (R5020, ZK97397, ZK98298 und RU486) behandelt. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgt mit Hilfe eines Sets unterschiedlicher 3' Primer. Die Primer bestehen aus einer Folge von elf Desoxythymidinen am 5' Ende und einer Kombination von zwei Basen am 3' Ende des Primers. Dabei kann die unmittelbar 3' gelegene Base eine der Basen A, C, G oder T (M') sein, während die vorletzte Base eine der Basen A, C oder G (N') darstellt. Die Struktur der 3' Primer ergibt sich daraus wie folgt:



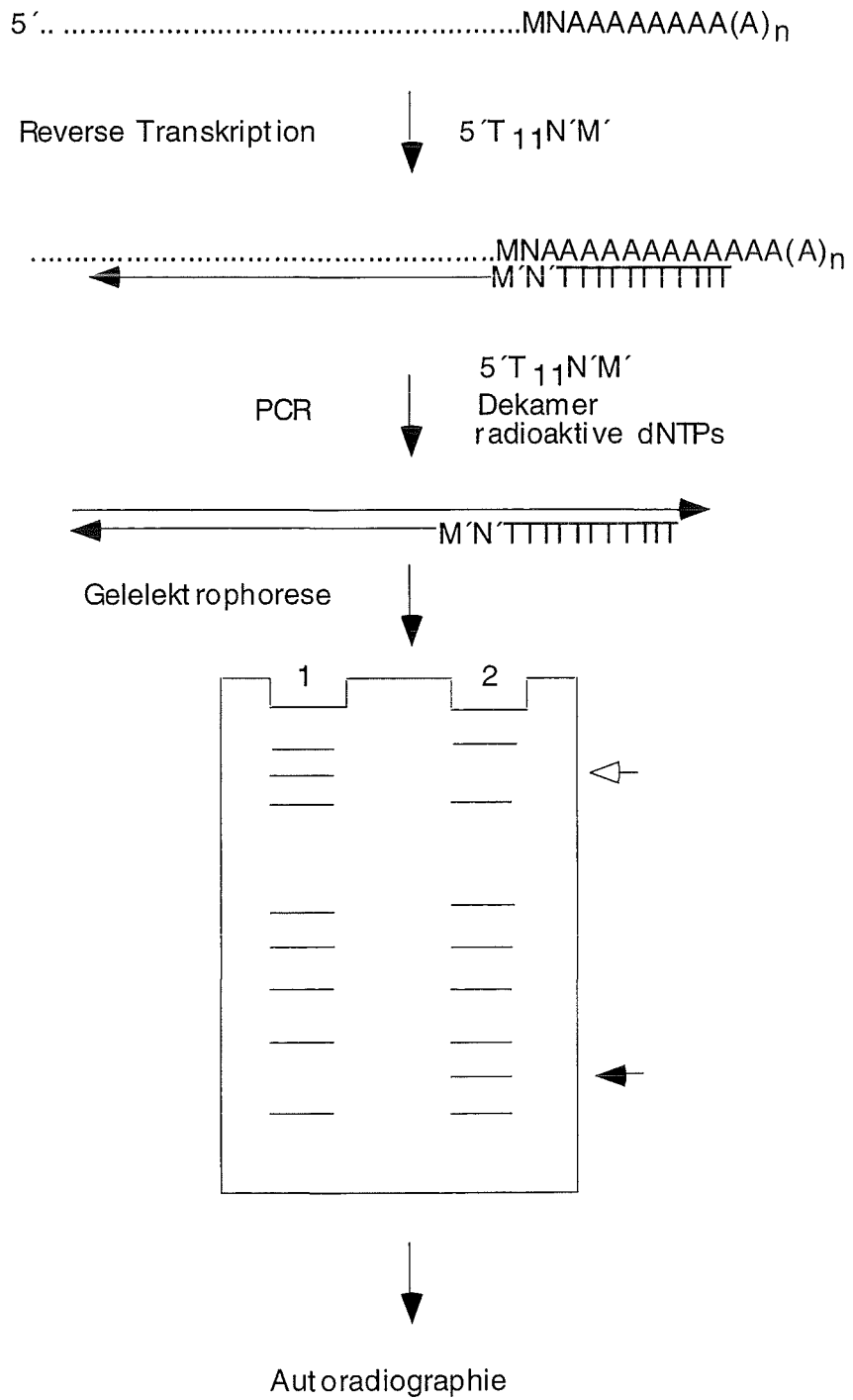
Zwölf verschiedene Primer sind notwendig, um annähernd sämtliche polyA⁺-mRNA Spezies in entsprechende cDNAs zu transkribieren. Diese cDNAs lassen sich nun mit einem zusätzlichen zweiten, einem 5' Primer, mit Hilfe der PCR amplifizieren. Bei den 5' Primern handelt es sich um Primer willkürlicher, aber definierter, Sequenz von zehn Basen Länge.

Eine Kombination von 26 verschiedenen 5' Primern ist ausreichend, um ca. 99 % aller cDNAs zu amplifizieren (Bauer *et al.*, 1993). Während der Amplifikation der cDNA in der PCR wird diese gleichzeitig radioaktiv markiert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt über ein denaturierendes 6 % Polyacrylamid-Sequenzgel. Die getrennten Fragmente lassen sich nach dem Trocknen des Gels autoradiographisch nachweisen. Die Abbildung 18 verdeutlicht das Prinzip des "differential display".

Differentiell exprimierte cDNA-Fragmente werden aus dem Polyacrylamidgel isoliert und dienen als Matrize für eine zweite PCR-Amplifikation mit denselben Primern und unter denselben Bedingungen. Eine radioaktive Markierung ist hierbei nicht mehr erforderlich, da ausreichend DNA Fragmente amplifiziert werden, die im Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden können. Diese reamplifizierten Fragmente werden anschließend in geeignete Vektoren kloniert.

Abb. 18 Prinzip des "differential display"

Mit Hilfe des Primers 5'-T₁₁N'M'-3' wird die poly A⁺mRNA in komplementäre cDNA transkribiert (M' = A, C, G oder T; N' = A, G oder C). Der T₁₁-Bereich des Primers wechselwirkt mit dem Poly A-Schwanz der mRNA, wobei die beiden 3' Basen (M', N') die Spezifität der 12 möglichen Primer bestimmen. Jeder der 12 möglichen 5'-T₁₁N'M'-3' führt zur Synthese einer spezifischen cDNA Population. Die cDNA wird in Gegenwart von radioaktiv markierten Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) in der PCR amplifiziert. Für diesen Schritt wird neben dem 5'-T₁₁N'M'-3' Oligonukleotid ein zusätzliches Dekamer mit bekannter, aber zufälliger, Nukleotidsequenz benötigt. Dieses Dekamer wechselwirkt mit komplementären Sequenzen im 5'-Bereich der cDNA. Die markierten PCR-Produkte werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie ausgewertet. Die Pfeile kennzeichnen cDNA-Fragmente die spezifischen mRNAs entsprechen, welche entweder nur in Extrakt 1 (offener Pfeil) oder nur in Extrakt 2 (ausgefüllter Pfeil) vorhanden sind.



7.1 Identifizierung eines hormonell induzierten Genfragments mittels “differential display”

Zur Identifizierung weiterer Antihormon-regulierter Gene wurden verschiedene Ansätze der humanen Brustkrebszelllinie T47D mit dem Agonisten R5020 oder den Antagonisten ZK97397, ZK98298, ZK98299 oder RU486 für vier beziehungsweise 24 Stunden behandelt. Ein Ansatz wurde nicht mit Hormonen behandelt. Bei der Behandlung der Zellen für vier Stunden sollten unmittelbar früh differentiell regulierte Gene bei der Behandlung über 24 Stunden sollten entsprechend spät differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Nach den genannten Zeiten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Für die reverse Transkription sowie die darauf folgende PCR-Amplifikation wurden 35 5' und 3' Primerkombinationen getestet (entspricht etwa 10 % der Kombinationsmöglichkeiten). Die amplifizierten Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Dabei zeigte sich, daß, mit einer Ausnahme, alle als differentiell exprimiert scheinenden Fragmente (ca. 80) bei weiteren Untersuchungen im Northern blot keine differentielle Regulation zeigten.

Die reverse Transkription von mRNA mit dem Primer dT₁₁AT (3'-Primer) und die anschließende PCR-Amplifikation mit dem 3'-Primer und dem 5'-Primer, 5'-CTTTCTACCC-3', führte zum Nachweis des in Abbildung 19 gezeigten Fragments 30.1.

Die Abbildung 19 zeigt, daß die Mehrzahl der amplifizierten Fragmente in allen Ansätzen unverändert auftritt (offener Pfeil, links). Die Expression dieser RNAs wird also nicht durch Hormonagonisten oder -antagonisten beeinflusst. Einige wenige Fragmente wurden lediglich in einem der PCR-Ansätze amplifiziert, nicht aber in dem jeweils komplementären Ansatz (offener Pfeil, rechts). Dabei handelt es sich vermutlich um PCR-Artefakte. Diese Fragmente wurden nicht weiter untersucht.

Ein Fragment, Fragment 30.1, zeigt eine hohe Amplifikationsrate in zwei komplementären PCR-Ansätzen (Spur 3 und 4), induziert durch das Hormon R5020. Es wurde aus dem Polyacrylamidgel isoliert und unter denselben Bedingungen und mit den gleichen 3'- und 5'- Primern wie bei der vorangegangenen PCR reamplifiziert.

Da das Fragment 30.1 als einziges Fragment nicht nur in der RT-PCR sondern auch im Northern blot eine hormonabhängige Regulation zeigte, wurde es in den Vektor pCRTM (Invitrogen) ligiert und in *E. coli* kloniert. Fragmente, die für Antihormon-regulierte Gene kodieren, wurden nicht gefunden. Möglicherweise ist es einfacher Agonist-induzierte Gene zu identifizieren als solche, die durch Antagonisten reguliert werden. Deshalb ist es notwendig zu zeigen, daß es sich bei dem Fragment 30.1 um ein Progesteron-reguliertes Gen handelt.

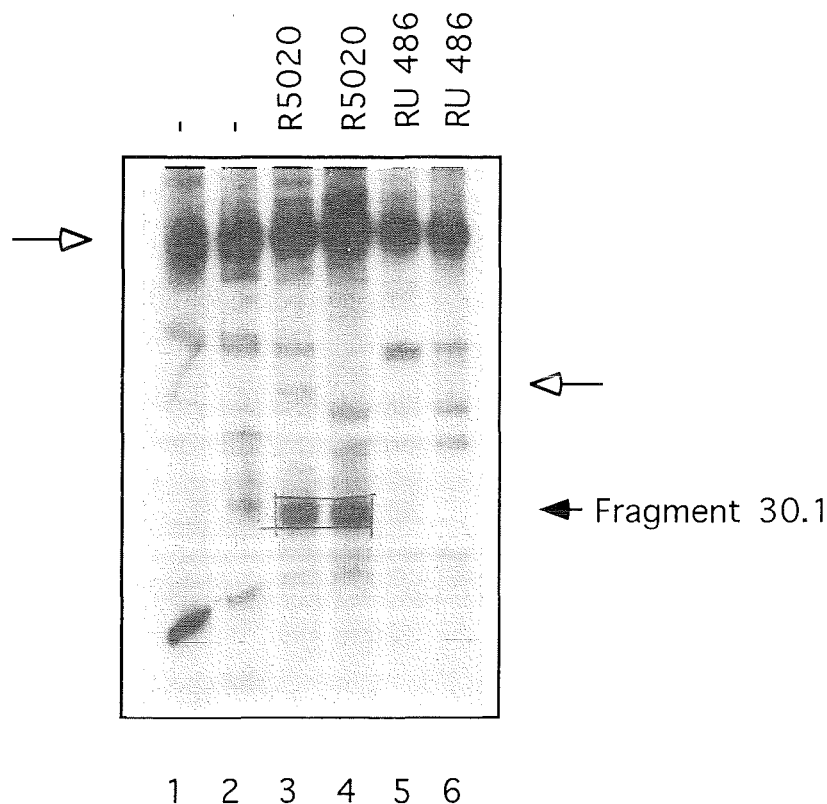


Abb. 19 Autoradiogramm von cDNA-Fragmenten, welche mit den Primern $dT_{11}AT$ (3') und 5'-CTTTCTACCC-3'(5') amplifiziert wurden.

Humane Brustkrebszellen, T47D, wurden ohne Hormon, mit dem Agonist R5020 und verschiedenen Antihormonen wie z. B. RU486 behandelt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels reverser Transkriptase und dem 3' Primer, $dT_{11}AT$, in die entsprechende cDNA transkribiert. Je Ansatz wurden zwei getrennte Aliquots der cDNA mit den Primern $dT_{11}AT$ (3') und 5'-CTTTCTACCC-3' (5') in der PCR amplifiziert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Ansätze paarweise (Spur 1 und 2; 3 und 4; 5 und 6) gelelektrophoretisch über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das mit einem ausgefüllten Pfeil markierte Fragment (30.1) wird ausschließlich in R5020-induzierten Zellen verstärkt exprimiert. Andere Gene (offener Pfeil, links) werden hormonunabhängig exprimiert. Die paarweise Amplifikation der Fragmente erleichtert das Erkennen falsch positiver Fragmente (offener Pfeil, rechts).

7.2 Nachweis der hormonabhängigen Regulation des differentiell exprimierten cDNA-Fragments mittels Northern blot Analyse

Die Induzierbarkeit des für das Fragment 30.1 kodierenden Gens durch R5020 wurde im Northern blot überprüft. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA der mit verschiedenen Hormonen behandelten Ansätze polyA⁺-RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Das klonierte Fragment 30.1 wurde mit der

Restriktionsendonuklease Eco RI aus dem Vektor ausgeschnitten, radioaktiv markiert und als Sonde für die Hybridisierung der polyA⁺-RNA verwendet. Dabei wurde festgestellt, daß die Induzierbarkeit des Gens durch R5020 im Northern blot wesentlich geringer ist, als aus dem "differential display" zu erwarten war.

Als Kontrolle wurde der Filter sowohl mit einer GAPDH- als auch einer MT IIA-Sonde hybridisiert. GAPDH wird als Haushaltsprotein in allen Zellen hormonunabhängig exprimiert und dient zur Quantifizierung der RNA. Die MT IIA-Sonde diente zum Nachweis des Metallothionein-Gens, welches durch R5020 induzierbar und somit ein Maß für die Expression Progesterin-abhängiger Gene ist.

Die Abbildung 20a zeigt das Hybridisierungsmuster für das Fragment 30.1, für MT IIA und GAPDH in der Northern blot Analyse. In Abbildung 20b ist die quantitative Auswertung der Northern blot Signale relativ zur GAPDH-Kontrolle dargestellt. Die Expression des Fragments 30.1 sowie von MT IIA durch die Behandlung der Zellen mit R5020 ist gegenüber unbehandelten Zellen um das 1,5 fache induziert. Die Behandlung der Zellen mit den Antagonisten RU486 sowie anderen Progesteronantagonisten z. B. ZK98299 bewirkt keine signifikante Änderung in der Expression des Fragments 30.1 und des MT IIA-Gens. Die Expression des durch das Fragment 30.1 kodierten Gens durch den Agonisten R5020 ist nicht sehr ausgeprägt. Jedoch unterscheidet sich die Induktion nicht von der des progesteronregulierten Metallothioneingens, MT IIA. Das Fragment 30.1 kodiert deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit für ein Gen, welches durch R5020 positiv reguliert wird.

Um zu bestimmen, ob es sich um ein bereits bekanntes oder ein bisher unbekanntes Genprodukt handelt, wurde das Fragment 30.1 sequenziert.

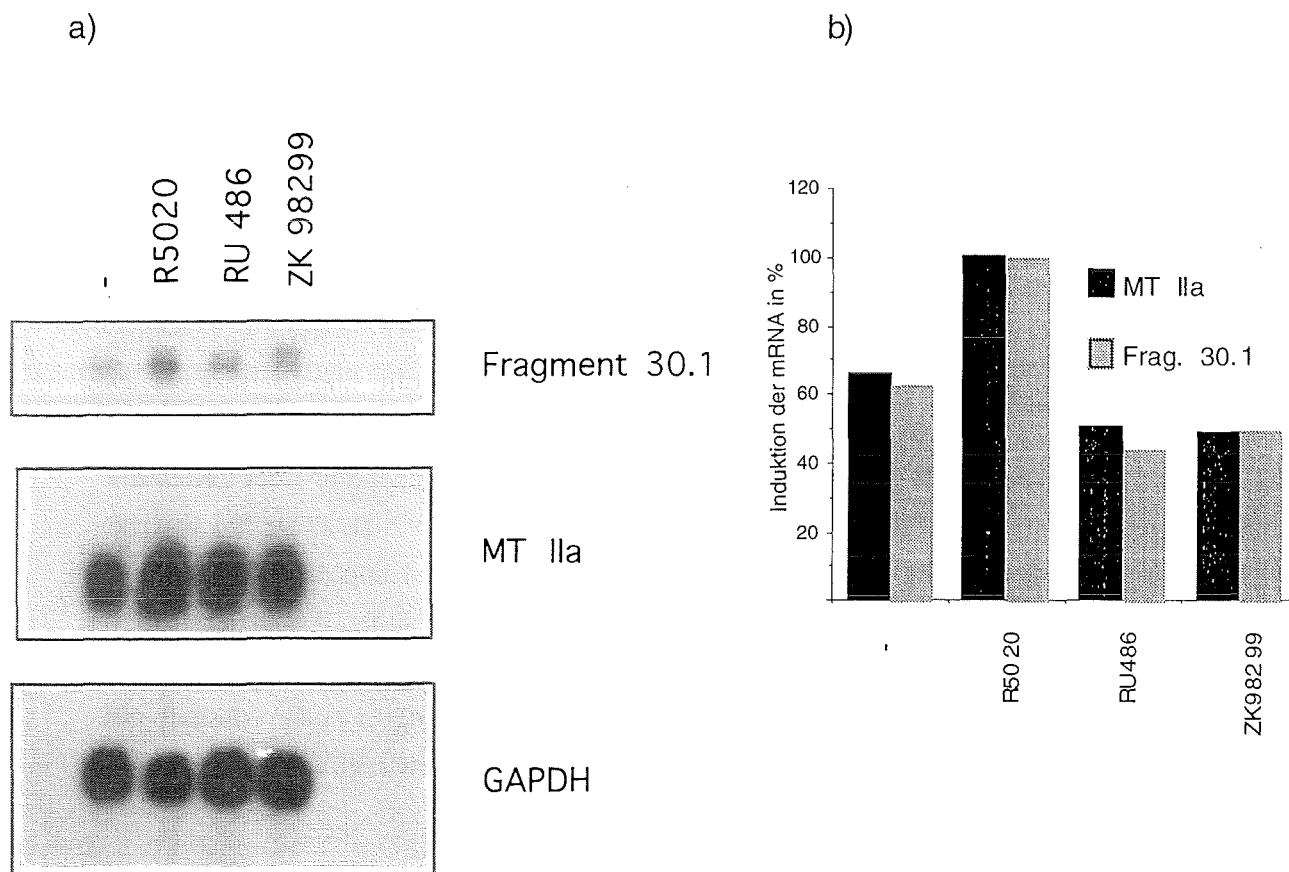


Abb. 20 a, b Northern blot Analyse des Fragments 30.1, sowie der Gene MT IIa und GAPDH.

T47D Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Hormonen behandelt. Anschließend wurde polyA⁺RNA geerntet, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Zur Hybridisierung wurde das differentiell exprimierte Fragment 30.1 sowie Sonden für die Gene GAPDH und MT IIa verwendet (a). Das Balkendiagramm zeigt die graphische Auswertung der Northern blot Analyse. Dabei wurde die Induktion der mRNA durch den Agonisten auf 100 % gesetzt. Die Werte für die Kontrollzellen sowie der antagonistbehandelten Ansätze wurden entsprechend berechnet (b).

7.3 Sequenzanalyse des Kones 30.1

In der Regel sind die im differential display erhaltenen Fragmente zwischen 150 und 400 Basenpaare lang, so daß man durch einmaliges Sequenzieren die komplette Sequenz des klonierten Fragments erhält. Das Fragment 30.1 wurde nach der Methode von Sanger (1977) sequenziert und die Sequenz im Computer mit der EMBL-Datenbank verglichen.

Die Sequenzanalyse zeigte, daß es sich bei dem klonierten Fragment um eine bereits bekannte Sequenz handelte, nämlich der β -Galaktosid-2,6-Sialyltransferase. Die Abbildung 21 zeigt eine über 90 %-ige Homologie des klonierten Fragments 30.1 mit der menschlichen Sialyltransferase (hST). Der sequenzierte Teil befindet sich im Bereich der Basen +1530 und +1710 des kodierenden Bereichs der Sialyltransferase.

Bei diesem Protein handelt es sich um ein im Golgi Apparat lokalisiertes Enzym, das die Ankopplung von Sialinsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäure) an terminale Zuckerreste von Gangliosiden bzw. Glycoproteinen katalysiert. Die Expression der Sialyltransferase ist abhängig vom Zelltyp (Kitagawa und Paulson, 1994; Aas-Eng *et al.*, 1995) und ist induzierbar durch verschiedene Wachstumsstimuli darunter dem Glucocorticoid Dexamethason (Vandamme *et al.*, 1993). Erhöhte Werte des Proteins konnten in verschiedenen Tumorgeweben und im Serum von Krebspatienten nachgewiesen werden (Reed *et al.*, 1993).

In diesem Teil der Arbeit sollten neue Gene identifiziert werden, welche durch Hormonantagonisten induziert beziehungsweise reprimiert werden. Mit Hilfe des "differential display" konnten mehrere DNA-Fragmente isoliert werden, die jedoch in der Northern blot Analyse keine Regulation der Genexpression durch Antagonisten zeigten. Lediglich das Fragment 30.1, welches als das Gen für die menschliche β -Galaktosid-2,6-Sialyltransferase identifiziert werden konnte, zeigte eine schwache hormonabhängige Regulation durch den Agonisten R5020. Die untersuchten Antagonisten zeigen jedoch keine signifikante Regulation des Gens gegenüber der Basalexpression. Antagonist-regulierte Gene konnten mit der Methode des "differential display" nicht identifiziert werden. Mögliche Gründe dafür werden in der anschließenden Diskussion genannt.

Diskussion

Die Hemmung der Steroidwirkung zur Behandlung verschiedener physiologischer Störungen wird schon seit längerer Zeit durchgeführt (Santen *et al.*, 1990; Agarwal *et al.*, 1987). So werden beispielsweise verschiedene Antiöstrogene wie Tamoxifen oder Diethylstilböstrol zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt. Substanzen wie Cyproteronacetat oder Casodex kommen bei der Therapie des Prostatakarzinoms zur Anwendung (Schneider, 1993). Dem gegenüber bilden Antigestagene eine neue Substanzklasse (Schneider, 1993).

Während Antiöstrogene und Antandrogene sehr selektiv mit dem Östrogen- oder dem Androgenrezeptor interagieren, besitzen RU486, der bekannteste Vertreter der Antiprogestine, wie auch die meisten Nachfolgesubstanzen hohe Affinität zum Glucocorticoidrezeptor und haben mehr oder weniger ausgeprägte antiglucocorticoide Wirkung (Philibert *et al.*, 1991).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der glucocorticoiden und antiglucocorticoiden Eigenschaften verschiedener Progesteronantagonisten. Die Interaktion dieser Substanzen mit dem Glucocorticoidrezeptor ist wesentlich für deren Nebenwirkungen verantwortlich.

Darüber hinaus wurde der Einfluß der Antigestagene auf die Regulation einiger Matrixmetalloproteinasen untersucht. Hierbei wurde deutlich, daß Antigestagene nicht nur in der Lage sind, die Wirkung von Progesteron zu antagonisieren, sondern auch die Expression spezifischer Gene zu induzieren.

1. Charakterisierung von Antiprogestinen mit verminderter Antiglucocorticoidwirkung

Frühere Studien haben gezeigt, daß verschiedene Substituenten an der C11- und C17-Position des Steroidgrundgerüsts die Funktion natürlicher Steroide umkehren und zu Substanzen mit antagonistischer Wirkung führen können (Beyer *et al.*, 1976; Hospital *et al.*, 1972). Hydrophobe Substituenten an der C17-Position bewirken in vielen Fällen eine höhere Affinität des Liganden zum Rezeptor, wohingegen Substitutionen an der C11-Position für die Stabilisierung einer biologisch inerten Rezeptorkonformation verantwortlich sind und dadurch die Aktivierung des Rezeptors verhindern (Baulieu, 1985).

Das Einführen aromatischer Reste (z. B. ein Dimethylaminophenyl-Rest) an der C11-Position, sowie die Modifikation der C17-Seitengruppe führte zur Synthese von Substanzen wie RU486 mit starken antigestagenen sowie antiglucocorticoiden Eigenschaften. Bei der

therapeutischen Anwendung von RU486 manifestieren sich diese antiglucocorticoiden Eigenschaften vor allem in Appetitlosigkeit, Übelkeit, Unwohlsein, Schwindelgefühl und Müdigkeit. Aber auch endokrine Effekte wie beispielsweise ein signifikanter Anstieg des Plasma-ACTH Spiegels (adrenocorticotropes Hormon) und des Plasma-Cortisol Spiegels, sowie ein erhöhter Androstendion- und Östradiol-Spiegel sind Begleiterscheinungen einer Antiprogestinbehandlung (Klijn *et al.*, 1994).

Es wurden verschiedene Modifikationen durchgeführt, um die Antiprogestin- und Antiglucocorticoidwirkung von Hormonantagonisten voneinander zu trennen. So wurde beispielsweise die Stellung der Ringe C und D von einer trans-Stellung in eine cis-Stellung überführt. Andere Modifikationen betrafen die Seitenkette am C17, wobei die Propynylgruppe, wie sie z.B. bei RU486 vorkommt, in einen Hydroxypropyl-Rest überführt wurde. Mit der Einführung solcher und weiterer Modifikationen soll die antiglucocorticoid Wirkung der Hormonantagonisten verringert werden.

Verschiedene Experimente wurden durchgeführt, um die antiglucocorticoid Wirkung dieser Steroidanaloga zu charakterisieren. Dabei wurde untersucht, in wieweit die Substanzen in der Lage sind, die Transaktivierung verschiedener Gene durch den Glucocorticoidrezeptor zu hemmen. Darüber hinaus wurde untersucht, wie diese Antihormone die Dexamethason-induzierte Apoptose von Thymocyten beeinflussen.

In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen an RU486 durchgeführten Modifikationen nicht zu einer verminderten Antiglucocorticoidwirkung geführt haben, mit Ausnahme der beiden Verbindungen ZK97397 und ZK98298. Im Gegensatz zu RU486, mit starker Antiglucocorticoidwirkung, besitzen diese beiden Verbindungen lediglich schwache antiglucocorticoid Eigenschaften. Sie unterscheiden sich von RU486 an der C17-Position, wo diese Substanzen anstelle eines 3-Propynyl- einen Hydroxypropyl-Rest besitzen.

Diese in Transfektionsexperimenten beobachtete reduzierte Antiglucocorticoidwirkung der beiden Substanzen konnte in Apoptosestudien bestätigt werden. In diesen Untersuchungen konnte die durch Dexamethason induzierte Apoptose in Mausthymozyten durch die beiden Antagonisten ZK97397 und ZK98298 nur schwach gehemmt werden, wohingegen RU486 die Dexamethasonwirkung stark inhibierte.

Die Tatsache, daß eine reduzierte Hemmung der Dexamethasonwirkung durch ZK97397 und ZK98298 mit einer verringerten Repression der durch Dexamethason induzierten Apoptose durch diese beiden Substanzen korreliert, deutet darauf hin, daß die transaktivierende Wirkung des Glucocorticoidrezeptors für eine Induktion der Apoptose notwendig ist. Hingegen führten Untersuchungen von Helmberg *et al.*, (1995) zu dem Ergebnis, daß die Glucocorticoid-induzierte Apoptose durch die reprimierende Wirkung des Rezeptors verursacht wird.

Eine dramatische Erhöhung der Konzentration der beiden Substanzen ZK97397 und ZK98298 führt ebenfalls zu einer Verstärkung der Antigluocorticoidwirkung dieser Verbindungen. Für diesen Effekt sind mehrere Gründe denkbar: möglicherweise besitzen die beiden Antagonisten schwächere Bindungsaffinitäten zum Glucocorticoidrezeptor als RU486. Zum anderen ist es denkbar, daß die Antagonisten ZK97397 und ZK98298 gegenüber dem Glucocorticoidrezeptor gewisse agonistische Wirkung besitzen. Studien, in denen die Affinität dieser Substanzen zum Glucocorticoidrezeptor untersucht wurden, haben gezeigt, daß ZK97397 und RU486 vergleichbare Bindungsaffinitäten zum Glucocorticoidrezeptor besitzen. Dennoch besitzt RU486 starke antigluocorticoide Eigenschaften im Gegensatz zu ZK97397. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die Affinität des Liganden zum Rezeptor nicht immer mit dessen Wirkung korreliert. Der Antagonist ZK98298 besitzt hingegen geringere Affinität zum Glucocorticoidrezeptor, was in Einklang mit seiner schwachen antigluocorticoiden Wirkung steht. Im allgemeinen ist die Bestimmung der relativen Bindungsaffinität ein geeigneter Parameter, um die Wirkung von Steroidhormonen zu bestimmen. Jedoch stimmen diese Aussagen nicht immer mit der Effektivität der Hormone in funktionellen Studien überein. Auch sagt die Bindungsaffinität eines Steroidhormons zum Rezeptor noch nichts darüber aus, ob die Substanz agonistische oder antagonistische Wirkung besitzt (Puri *et al.*, 1991).

Die Möglichkeit, wonach eine agonistische Wirkung die schwache antigluocorticoide Aktivität von ZK97397 bewirkt, konnte in Transfektionsexperimenten und Northern blot Analysen nicht bestätigt werden. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse zu erwähnen, daß ein agonistischer Effekt der Antihormone auch in den Apoptoseuntersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Vergleicht man die Struktur der beiden Hormonantagonisten untereinander und mit RU486, so ist auffällig, daß die schwachen Antigluocorticoide ZK97397 und ZK98298 einen 3-Hydroxypropyl-Rest am C17-Atom in β -Position besitzen. Diese Ergebnisse zeigen, welche entscheidende Bedeutung die Seitenkette an der C17-Position für eine reduzierte Antigluocorticoidwirkung solcher Verbindungen besitzt. Experimente, in denen Substanzen verglichen wurden, die sich nur in der C13-Position unterschieden, zeigten, daß diese Position keinen Einfluß auf die antigluocorticoide Wirkung besitzt. Arbeiten von Neef *et al.*, (1984), wonach der Steroidantagonist ZK98299 schwache Antigluocorticoidaktivität besitzt, konnten hier nicht bestätigt werden. Daß die C17-Position eine wichtige Rolle spielt bezüglich einer reduzierten Antigluocorticoidwirkung zeigen nicht nur Substanzen mit einem 3-Hydroxypropyl-Rest in β -Stellung (wie in dieser Arbeit untersucht), sondern auch Spiroätherverbindungen wie die Substanzen RU46556 und RU49295 (Philibert *et al.*, 1991) oder Verbindungen der Firma Organon, Org31710 und Org31806, (Kloosterboer *et al.*, 1994). Obwohl diese Substanzen mit hoher Affinität an den Glucocorticoidrezeptor binden, sind sie nur schwach antigluocorticoid wirksam. Hingegen besitzen diese Verbindungen beachtliche androgene Eigenschaften. Diese androgene

Aktivität der Antihormone hat möglicherweise ähnliche Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung des Endometriums wie Progesteron (Schreiber *et al.*, 1983; Philibert *et al.*, 1991), weshalb diese Substanzen (RU46556, RU49295, Org31710 und Org31806) nicht als Antiprogestine einsetzbar sind. Ein Vergleich mit der androgenen Wirkung von ZK97397 und ZK98298 zeigte, daß ZK97397 eine dem RU486 vergleichbare androgene Wirkung besitzt, wohingegen ZK98298 wesentlich schwächer androgen wirksam ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Steroidantagonisten sind jedoch wesentlich weniger androgen wirksam als der synthetische Androgenagonist Miboleron.

Die hier durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß es bisher nicht möglich ist, die antigestagene und die antiglucocorticoide Wirkung von Antihormonen vollständig zu trennen. Es ist zweifelhaft, ob es möglich sein wird, reine Progesteronantagonisten zu synthetisieren. Aufgrund der hohen Homologie der Hormonbindedomäne der verschiedenen Steroidhormonrezeptoren können die verschiedenen Modifikationen am Steroidgrundgerüst der Hormonantagonisten auch zu Interaktionen mit verwandten Steroidhormonrezeptoren führen. Möglicherweise lassen sich diese Schwierigkeiten mit der Entwicklung nicht-steroidaler Verbindungen umgehen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß nicht-steroidale Substanzen wie Hydroxyflutamid oder Casodex spezifische Inhibitoren für den Androgenrezeptor und Tamoxifen ein Inhibitor des Östrogenrezeptors darstellen. Ein Nachteil dieser nicht-steroidalen Substanzen besteht darin, daß sie in der Regel eine geringe Affinität zum Rezeptor besitzen und daher in hohen Dosen verabreicht werden müssen. In hohen Konzentrationen wirken diese Substanzen jedoch häufig toxisch auf den Organismus.

2. Einfluß von Antigestagenen auf die Regulation AP-1 abhängiger Gene am Beispiel einiger Matrixmetalloproteinasen

Steroidhormone sind in der Lage die Expression von Genen sowohl zu induzieren als auch zu reprimieren. Während die positive Regulation der Genexpression mittlerweile sehr gut untersucht ist, ist die Negativwirkung der Steroidhormone weit weniger gut verstanden. Negativregulation von Genen erfolgt über verschiedene Mechanismen, beeinflußt jedoch immer die Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion von Steroidhormonrezeptoren mit den Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie. Bei der Mehrzahl der bisher untersuchten Gene führt eine Wechselwirkung zwischen Steroidhormonrezeptor und AP-1 zur Repression der Genexpression. Deshalb muß bei der Untersuchung von Progesteronantagonisten deren Einfluß auf die Negativwirkung bezüglich der Genexpression berücksichtigt werden.

Wie der Glucocorticoidrezeptor ist auch der Progesteronrezeptor in der Lage, die Expression von Matrixmetalloproteinasen zu inhibieren. Matrixmetalloproteinasen sind wesentlich an der Degradation epithelialer Zellen im Uterus während der Menstruation beteiligt. In dieser Phase des Monatszykluses ist der Progesteronspiegel niedrig, d.h. die Expression der Matrixmetalloproteinasen wird nicht durch Progesteron reprimiert. Hingegen steigt der Progesteronspiegel während der Proliferations- und der Sekretionsphase des Zykluses an. Dadurch wird zum einen die Gebärmutter Schleimhaut optimal für die Aufnahme der befruchteten Blastozyste vorbereitet, zum anderen wird die Degradation der Schleimhaut durch die Wirkung der verschiedenen Matrixmetalloproteinasen wirksam verhindert.

Wird der Organismus in der Proliferationsphase oder während einer bereits eingetretenen Schwangerschaft mit dem Progesteronantagonist RU486 behandelt, kommt es zu einem sofortigen und massiven Abbau der Uterusschleimhaut (Brodgen *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, daß Antigestagene, wie z. B. RU486, die hemmende Wirkung des Progesterons bezüglich der Repression der Matrixmetalloproteinasen aufheben.

Versuche in dieser Arbeit haben bestätigt, daß sich die Expression des Gens für Collagenase 1 durch den Phorbol ester TPA in CV 1-Zellen induzieren läßt. Diese Induktion wird im wesentlichen durch den Transkriptionsfaktor AP-1 vermittelt. AP-1 ist ein Heterodimer aus je einem Mitglied der Jun und der Fos Familie oder aber ein Homodimer aus Mitgliedern der Jun Familie (Angel und Karin, 1991). Die AP-1-induzierte Expression der Collagenase 1 wird durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem synthetischen Progesteronagonisten R5020 nahezu vollständig reprimiert. Diese hemmende Wirkung von R5020 ließ sich durch die gleichzeitige Verabreichung der Progesteronantagonisten nicht aufheben. Auch die Progesteronantagonisten alleine verabreicht, besaßen auf die TPA-Induktion den gleichen hemmenden Effekt wie der Agonist R5020.

Dieses Ergebnis stimmte aber nicht mit den oben beschriebenen Effekten überein, wonach die Repression verschiedener Matrixmetalloproteinasen durch R5020 in der Gebärmutter Schleimhaut mittels des Progesteronantagonisten RU486 wieder aufgehoben werden konnte (Bygdeman *et al.*, 1994).

Eine mögliche Erklärung für das Verhalten der Antagonisten in CV 1-Zellen im Unterschied zur biologischen Wirkung von RU486 auf die Uterusschleimhaut, ist eventuell auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1 in den beiden Systemen zurückzuführen. Es ist denkbar, daß die Regulation der Collagenase 1-Expression in CV 1-Zellen durch einen anderen AP-1 Komplex erfolgt, als dies in Zellen des Endometriums der Fall ist. So bestehen beispielsweise Unterschiede bei der Repression der AP-1 Wirkung durch den Glucocorticoidrezeptor in Abhängigkeit davon, ob es sich bei AP-1 um ein c-Jun/c-Fos oder um ein JunB/Fra Komplex handelt. Im Falle eines c-Jun Homodimers wirkt der Glucocorticoidrezeptor sogar synergistisch auf die Genexpression (Teurich und Angel,

1995), hingegen reprimiert der Rezeptor die AP-1 Wirkung, wenn es sich um einen c-Jun/c-Fos-Komplex handelt (Angel und Karin, 1991).

Weiterhin ist es denkbar, daß am Abbau der Uterusschleimhaut nicht die Collagenase 1 maßgeblich beteiligt ist, sondern eine oder mehrere Matrixmetalloproteinasen, deren Expression auf andere Weise reguliert wird, als im Falle des Collagenase 1-Gens.

Um die reprimierende Wirkung der Progesteronantagonisten auf die Aktivität verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMP) untersuchen zu können, wurden weitere Experimente direkt am Tier durchgeführt. Um herauszufinden, wie die Progesteronantagonisten die Expression der MMP beeinflussen, wurde Endometriumgewebe aus Kaninchen untersucht, die zuvor mit dem Progesteronantagonisten ZK98299 behandelt wurden. In der RNA aus dem Endometrium konnte außer Matrilysin keine der untersuchten Matrixmetalloproteinasen im Northern blot nachgewiesen werden.

Dieser Befund bestätigt Angaben aus der Literatur, wobei es sich bei der einzigen in epithelialen Zellen des Endometriums exprimierten Matrixmetalloprotease um Matrilysin handelt (Rodgers *et al.*, 1994; Rodgers *et al.*, 1993). In Untersuchungen mit der RNA aus Kaninchenendometrium konnte Matrilysin lediglich nachgewiesen werden, wenn die Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Hormonantagonisten ZK98299 behandelt wurden.

Warum Matrilysin nicht auch dann nachgewiesen werden konnte, wenn die Kaninchen nur einmal mit ZK98299 behandelt wurden, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß im Uterus dieser Tiere noch zuviel Gesamt-RNA vorhanden ist, um die geringen Mengen an Matrilysin-RNA nachweisen zu können. Hingegen ist bei dreimaliger Behandlung mit ZK98299 bereits ein Großteil des Endometriums degradiert, so daß die Matrilysin-RNA in der noch verbleibenden Gesamt-RNA nachgewiesen werden kann.

Die Applikation von ZK98299 für drei Tage führte zum Nachweis von Matrilysin-mRNA im Endometrium von Kaninchen. Zwei mögliche Wirkungen von ZK98299 sind denkbar: die Expression von Matrilysin im Endometrium wird durch den hohen Progesteronspiegel der scheinchwangeren Kaninchen reprimiert. Die Verabreichung eines Progesteronantagonisten bewirkt eine Aufhebung der hemmenden Wirkung des Progesterons. Dadurch kommt es zur Expression des Matrilysingens. Zum anderen ist es vorstellbar, daß die Substanz ZK98299 die Expression dieses Gens induziert.

Eine Hemmung der Matrilysinexpression durch Progesteron ist vermutlich auszuschließen, da in diesem Falle auch in denjenigen Kaninchen Matrilysin nachweisbar sein müßte, die sich im frühen Stadium der Scheinschwangerschaft befinden, d. h. wenn der Progesteronspiegel in den mit Gonadotropin behandelten Tieren noch niedrig ist.

Um den Einfluß des Progesteronantagonisten ZK98299 auf die Expression des Matrilysingens eingehender untersuchen und diese Ergebnisse mit anderen Hormon-

antagonisten, z. B. ZK97397 und ZK98298, vergleichen zu können, wurden zusätzliche Untersuchungen in einem geeigneten Zellkultursystem durchgeführt. Für diese Experimente wären Zellen aus dem Endometrium von Kaninchen geeignet. Da solche Zellen jedoch nicht verfügbar waren, wurde eine humane Endometriumzelllinie (EFE-184) verwendet, die das Matrilysin endogen exprimiert.

Diese Zellen wurden mit einem Matrilysinpromotor-CAT-Konstrukt transfiziert. Die Behandlung dieser Zellen mit dem Progesteronantagonisten ZK98299 alleine führte nicht zu einer Induktion des CAT-Gens, wie im Falle der Expression des Matrilysins in Kaninchen. Möglicherweise unterscheiden sich die beiden Gene aus Mensch und Kaninchen bezüglich ihrer Regulation und sind deshalb nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Die gleichzeitige Gabe von TPA und Progesteronantagonist jedoch führte zu einer deutlichen Induktion des Matrilysinpromotors. Diese Induktion ist auf einen möglichen synergistischen Effekt zurückzuführen. Ähnliche synergistische Effekte wurden bereits für die Interaktion zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Jun/Jun-Homodimer) beschrieben (Teurich und Angel, 1995).

Wurde die Situation, welche in einem scheinchwangeren Kaninchen zur Expression von Matrilysin geführt hat, durch die gleichzeitige Verabreichung von TPA, dem Progesteronagonisten R5020 und ZK98299 simuliert, so wurde das CAT-Gen stärker exprimiert, als durch die Behandlung mit TPA und ZK98299. Ein ähnliches Verhalten zeigt die Verbindung ZK98298 (eine der Substanzen mit schwacher antiglucocorticoider Wirkung). Hingegen besitzen die Antagonisten ZK97397 und RU486 zusammen mit TPA (und auch in Kombination mit R5020) verabreicht, keine synergistische Wirkung.

Weshalb die Aktivierung des Matrilysinpromotors durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TPA, R5020 und einem der Antagonisten ZK98298 oder ZK98299 zu dieser starken Geninduktion führt, kann im Moment nur vermutet werden. Möglicherweise spielt die "Heterodimerisierung" eines Agonist- und eines Antagonist-induzierten Rezeptordimers dabei eine Rolle. Für den Antagonisten RU486 und den Agonisten R5020 konnte eine solche "Heterodimerbildung" bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Meyer *et al.*, 1990). Es ist aber denkbar, daß die Antiprogestin-besetzten Progesteronrezeptoren in der Lage sind mit R5020 aktivierten Rezeptoren "Heterodimere" zu bilden. Dies ist möglicherweise für die beiden Progesteronantagonisten ZK98298 und ZK98299 der Fall. Ein solches Heterodimer aus Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptoren könnte dann aufgrund struktureller Besonderheiten in der Lage sein, die Genexpression zu verstärken. Hingegen ist die Verbindung ZK97397, in Analogie zu RU486 nicht befähigt, solche "Heterodimere" zu bilden. Der Nachweis solcher "Heterodimere" wäre ein neuer Aspekt bei der Regulation der Genexpression durch den Progesteronrezeptor.

Eine mögliche Induktion von Matrilysin durch Antigestagene kann aber mit Problemen verbunden sein. So wurde in der Literatur beschrieben, daß eine erhöhte Expression von Matrilysin bei verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise Brustkrebs oder Dickdarmkrebs zu einer erhöhten Metastasierungsrate geführt hat (Newell *et al.*, 1994; O'Grady *et al.*, 1981). Eine Induktion von Matrilysin oder weiterer, bisher nicht untersuchter, Metalloproteinasen durch Antigestagene könnte den Vorgang der Metastasierung unterstützen und beschleunigen. Es ist daher von großer Bedeutung zu wissen, warum Progesteronantagonisten, wie ZK98298 und ZK98299, die Induktion von Matrixmetalloproteinasen stimulieren und warum die Antiprogestine ZK97397 oder RU486 keine solche stimulierende Wirkung besitzen.

3. Auf der Suche nach Antagonist-regulierten Genen mit Hilfe des "differential display"

Frühere Untersuchungen (Michna *et al.*, 1992) haben gezeigt, daß die Wirkung der Progesteronantagonisten nicht alleine auf eine kompetitive Hemmung des Rezeptors beschränkt ist, sondern daß sie darüber hinaus in der Lage sind, die Regulation bestimmter Gene zu beeinflussen, die zu einer terminalen Differenzierung und damit schließlich zum natürlichen Tod der Zelle führen. Die Identifizierung solcher Gene sowie die Charakterisierung ihrer Genprodukte, würden wesentlich dazu beitragen, die hemmende Wirkung von Progesteronantagonisten auf das Tumorwachstum zu verstehen. Diese Genprodukte besitzen möglicherweise einen Einfluß auf den Zellzyklus, und ist es denkbar, daß nach der Behandlung von Zellen mit Progesteronantagonisten Gene exprimiert oder reprimiert werden, deren Produkte bei An- oder Abwesenheit eine Arretierung des Zellzyklus bewirken (Michna *et al.*, 1992).

Verschiedene experimentelle Ansätze, wie beispielsweise subtraktive Hybridisierung oder "differential screening", ermöglichen eine Identifizierung solcher Gene. In dieser Arbeit wurde die Methode des "differential display" (Liang und Pardee, 1992) verwendet, da diese Technik gegenüber der subtraktiven Hybridisierung gewisse Vorteile besitzt: Zum einen können gleichzeitig differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die sowohl induziert als auch reprimiert werden. Zum anderen können parallel mehrere Ansätze miteinander verglichen werden, die mit verschiedenen Hormonen oder Antihormonen behandelt wurden. Darüber hinaus liefert die Amplifikation differentiell exprmierter Fragmente gleich eine passende Sonde, um die differentielle Expression entsprechender Gene im Northern blot zu verifizieren.

In dieser Arbeit wurden 35 Primerkombinationen (etwas über 10 % der möglichen Kombinationen) getestet. Dabei wurden ca. 80 differentiell exprimierte Genfragmente isoliert. Alle diese möglichen Kandidaten wurden im Northern blot daraufhin untersucht, ob

sie durch die Antagonisten ZK98299 und RU486 induzierbar oder reprimierbar sind. Keiner der Kandidaten zeigte eine durch die Antagonisten beeinflusste Regulation der Expression. Nur eines der Fragmente (Fragment 30.1) zeigte im "differential display" eine starke und im Northern blot reproduzierbare Induktion der Genexpression durch den Agonisten R5020. Weitere Untersuchungen im Northern blot haben jedoch gezeigt, daß dieses Gen durch den Agonisten R5020 nur schwach induziert wird.

Diese Untersuchungen und Hinweise aus der Literatur haben gezeigt, daß die Methode des "differential display" häufig zu "falsch positiven" Signalen führt, die sich bei genaueren Untersuchungen nicht als differentiell exprimierte Gene erweisen (Guimaraes *et al.*, 1995; Sompayrac *et al.*, 1995; Hadman *et al.*, 1994; Callard *et al.*, 1994).

Ein weiterer Grund, weshalb keine Antagonist-regulierten Gene gefunden wurden, ist möglicherweise darin zu suchen, daß lediglich ca. 10 % der möglichen Primerkombinationen getestet werden konnten. Obwohl einige Gene bekannt sind, die durch den Agonisten R5020 induziert werden, konnte hier nur eines dieser Gene identifiziert werden. Die Zahl der durch die Antagonisten beeinflussten Gene ist vermutlich nicht höher als die Zahl der Progesteron-regulierten Gene. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß durch die Untersuchung weiterer Primerkombinationen Antagonist-regulierte Gene gefunden werden. Obwohl die Methode des "differential display" gegenüber anderen Screeningverfahren einige Vorteile besitzt, sind bisher mit Hilfe dieser Methode nur einige wenige differentiell exprimierte Gene gefunden worden (Chapman *et al.*, 1995; Zimmermann und Schultz 1994; Liang *et al.*, 1993). Rechnet man den zeitlichen Aufwand zur Amplifikation der cDNA mit annähernd 300 Primerkombinationen (Bauer *et al.*, 1993), sowie die Anstrengungen für die Isolierung, Reamplifizierung und Klonierung "falsch positiver" Klone, so wird deutlich, daß das "differential display" ein aufwendiges Verfahren mit ungewissem Ausgang darstellt. Es werden daher große Anstrengungen unternommen, um "falsch positive" Klone zu eliminieren (Hadman *et al.*, 1994; Callard *et al.*, 1994, van der Burg persönliche Mitteilung).

Trotz der oben genannten Schwierigkeiten konnte mit Hilfe des "differential display" ein Progesteron-abhängiges Gen identifiziert werden. Gene, deren Regulation durch Antigestagene kontrolliert wird, wurden mit Hilfe des "differential display" nicht gefunden.

Jedoch ist die Induktion des Matrilysingens durch Antiprogestine ein Beispiel dafür, daß Gene existieren, die sowohl im Tier als auch in Zellkultur einer solchen Regulation unterliegen. Die Expression des Matrilysingens durch ZK98299 spricht dafür, die Suche nach Antihormon-regulierten Genen mit etablierten Verfahren oder mit einer modifizierten Methode des "differential display" fortzusetzen.

Literatur

Aas-Eng, D. A., Åsheim, H. C., Deggerdal, A., Smeland, E., Funderud, S. (1995)

Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells.

Biochem. Biophys. Acta **1261**: 166-169

Allan, G. F., Leng, X., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Edwards, D. P., Tsai, M. J., O'Malley, B. M. (1992)

Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation.

J. Biol. Chem. **267**: 19513-19520

Angel, P., Karin, M. (1991)

The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.

Biochem. Biophys. Acta **1072**: 129-157

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. (1991)

Current Protocols in Molecular Biology

J. Wiley and Sons, New York

Bagchi, M. K., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., O'Malley, B. W. (1992)

Ligand and DNA dependent phosphorylation of human progesterone receptor *in vitro*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 2664-2673

Bai, W., Weigel, N. L. (1996)

Phosphorylation of Ser²¹¹ in the chicken progesterone receptor modulates its transcriptional activity.

J. Biol. Chem. **271**: 12801-12806

Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. (1993)

Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display.

Nucleic Acids Res. **21**: 4272-4280

Baughman, G., Harrigan, M. T., Campbell, N. F., Nurrish, S. J., Bourgeois, S. (1991)

Genes newly identified as regulated by glucocorticoids in murine thymocytes.

Mol. Endocrinol. **5**: 637-644

Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strähle, U., Schütz, G. (1986)

In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of hormone.

Nature **324**: 686-688

Beyer, B., Terenius, L., Brueggemeier, R. W., Ranade, V. V., Counsell, R. E. (1976)

Synthesis of potential antiprogestins.

Steroids **27**: 123-131

Bresnick, E. H., Dalman, F. C., Sanches, E. R., Pratt, W. B. (1989)

Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **264**: 4992-4997

Briehl, M. M., Flomerfelt, F. A., Wu, X. P., Miesfeld, R. L. (1990)

Transcriptional analyses of steroid-regulated gene networks.

Mol. Cell. Endocrinol. **4**: 287-294

Brogden, R. N., Goa, K. L., Faulds, D. (1993)

Mifepristone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential.

Drug **45**: 384-409

Bygdeman, M., Swahn, M.-L., Gemzell-Danielson, K., Gottlieb, C. (1994)

The use of progesterone antagonists in combination with prostaglandin for termination of pregnancy.

in: Beier, H. M., Spitz, I. M. (eds.): Progesterone antagonists in reproductive medicine and oncology. Oxford University Press, 121-125

Callard, D., Lescure, B., Mazzolini, L. (1994)

A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique.

BioTechniques **16**: 1096-1103

Carlstedt-Duke, J., Strömstedt, P.-E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J.-Å., Jörnvall, H. (1988)

Identification of hormone-interacting amino acid residues within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone receptors.

J. Biol. Chem. **263**: 6842-6846

Cato, A. C. B., Weinmann, J. (1988)

Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells.

J. Cell. Biol. **106**: 2119-2125

Cato, A. C. B. (1994)

Steroid receptors-AP-1 interaction: Cross-coupling of signal transduction pathways.

in: The FOS and JUN Families of Transcription Factors; ed. P.E. Angel und P. A. Herrlich
CRC Press London: 49-59

Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., Evans, R. M. (1996)

Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling.

Nature **383**: 99-103

Chapman, M. S., Qu, N., Pascoe, S., Chen, W.-X., Apostol, C., Gordon, D., Miesfeld, R. L. (1995)

Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid-responsive cells using mRNA differential display.

Mol. Cell. Endocrinol. **108**: R1-R7

Chromczynski, P., Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem. **161**: 156-159

Clark, A. R., Docherty, K. (1993)

Negative regulation of transcription in eukaryotes.

Biochem. J. **296**: 521-541

Dahlman-Wright, K., Siltala-Roos, H., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-Å. (1990)

Protein-protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain.

J. Biol. Chem. **265**: 14030-14035

Dahlman-Wright, K., Wright, A. P. H., Gustafsson, J.-Å., Carlstedt-Duke, J. (1991)

Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated via a short segment of five amino acids.

J. Biol. Chem. **266**: 3107-3112

Denner, L. A., Schrader, W. T., O'Malley, B. W., Weigel, N. L. (1990a)

Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites.

J. Biol. Chem. **265**: 16548-16555

Denner, L. A., Weigel, N. L., Maxwell, B. L., Schrader, W. T., O'Malley, B. W. (1990b)

Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation.

Science **250**: 1740-1744

Denis, M., Gustafsson, J.-Å., Wilkström, A.-C. (1988)

Interaction of the Mr=90,000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **263**: 18520-18523

Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., Yamamoto, K. R. (1990)

Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element.

Science **249**: 1266-1272

Drouin, J. (1993a)

Repression of transkription by nuclear receptors.

in: Steroid hormone action, Parker, M. G. (ed), IRL Press Oxford, 118-140

Drouin, J., Sun, Y. L., Chamberland, M., Gauthier, Y., DeLéan, A., Nemer, M., Schmidt, T. J. (1993b)

Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene.

EMBO J. **12**: 145-156

Evans, R. M., Hollenberg, S. M. (1988)

Zinc fingers: gilt by association.

Cell **52**: 1-3

Freedman, L. P., Towers, T. (1991)

DNA binding properties of the vitamin D₃ receptor zinc finger region.

Mol. Endocrinol. **5**: 1815-1826

Gaire, M., Magbanua, Z., McDonnell, S., McNeil, L., Lovett, D. H., Matrisian, L. M. (1994)

Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase Matrilysin.

J. Biol. Chem. **269**: 2032-2040

Gasc, J.-M., DeLahaye, F., Baulieu, E.-E. (1989)

Compared intracellular localization of the glucocorticoid and progesterone receptors: an immunocytochemical study.

Exp. Cell. Res. **181**: 492-504

Giguère, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M. (1986)

Functional domains of the human glucocorticoid receptor.

Cell **46**: 645-652

Greenspan, F. S., Baxter, J. D. (1993)

Basic and clinical endocrinology

Appleton and Lange, Norwalk

Guimaraeset, M. J., Lee, F., Zlotnik, A., McClanahan, T. (1995)

Differential display by PCR: novel findings and applications.

Nucleic Acids Res. **23**: 1832-1833

Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E. (1994)

Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor.
Biochem. Pharmacol. **47**: 21-24

Hadman, M., Adam, B.-L., Wright, G. L., Bos, T. J. (1995)

Modifications to the differential display technique reduce background and increase sensitivity.
Anal. Biochem. **226**: 383-386

Hanna-Rose, W., Hansen, U. (1996)

Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors.
TIG **12**: 229-234

Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C., Karin, M. (1995)

Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor.
EMBO J. **14**: 452-460

Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C. (1993)

Hormonal chemoprevention of cancer in women.
Science **259**: 633-638

Hollenberg, S. M., Giguère, V., Segui, P., Evans, R. M. (1987)

Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor.
Cell **49**: 39-46

Hollenberg, S. M., Evans, R. M. (1988)

Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor.
Cell **55**: 899-906

Hospital, M., Busetta, B., Bucourt, R., Weintraub, H., Baulieu, E. E. (1972)

X-ray crystallography of estrogens and their binding to receptor sites.
Mol. Pharmacol. **8**: 438-445

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 hsp 90 and protection from proteolytic cleavage.

J. Biol. Chem. **265**: 12778-12781

Howard, P. R., Holley, S. J., Yamamoto, K. R., Distelhorst, C. W. (1990)

Mapping the hsp 90 binding region of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **265**: 11928-11935

Ing, N. H., Beekman, J. M., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., O'Malley, B. W. (1992)

Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TF IIB (S300-II).

J. Biol. Chem. **267**: 17617-17623

Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P. (1990)

Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone.

Cell **62**: 1189-1204

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.-C., Rosenfeld, G. (1996)

A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-I inhibition by nuclear receptors.

Cell **85**: 403-414

Kaspar, F., Klockner, H., Denninger, A., Cato, A. C. B. (1993)

A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: identification of the function of a conserved alanine residue in the D box of steroid receptors.

Mol. Cell. Biol. **13**: 7850-7858

Kastner, P., Bocquel, M. T., Turcotte, B., Garnier, J. M., Horwitz, K. B., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1990)

Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanisms generating two receptor isoforms.

J. Biol. Chem. **265**: 12163-12167

King, R. B. J. (1991)

A discussion of the roles of oestrogen and progestin in human mammary carcinogenesis.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **39**: 811-818

King, W. J., Greene, G. L. (1984)

Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.
Nature **307**: 745-747

Kitagawa, H., Paulson, J. C. (1994)

Differential expression of five Sialyltransferase genes in human tissues.
J. Biol. Chem. **269**: 17872-17878

Klein-Hitpass, L., Cato, A. C. B., Henderson, D., Ryffel, G. U. (1991)

Two types of antiprogestins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from T47D cells.
Nucleic Acids Res. **19**: 1227-1234

Klijn, J. G. M., Setyono-Han, B., Sander, H.L., Lamberts, S. W. J., de Jong, F. H., Deckers, G. H., Foekens, J.A. (1994)

Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogestins.
Human Reproduction **9**: 181-189

Klijn, J. G. M., De Jong, F. H., Bakker, G. H., Lamberts, S. W. J., Rodenburg, C. J., Alexieva-Figusch, J. (1989)

Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer.
Cancer Res. **49**: 2851-2856

Kloosterboer, H. J., Deckers, G. H., Schoonen, W. G. E. J. (1994)

Pharmacology of two new very selective antiprogestins: Org31710 and Org31806.
in: Beier, H. M., Spitz, I. M. (eds.): Progesterone antagonists in reproductive medicine and oncology. Oxford University Press, 47-52

König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, J.-H., Herrlich, P. (1992)

Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo.
EMBO J. **11**: 2241-2246

Krusche, C., Beier, H. M. (1994)

Localization of uteroglobin mRNA by nonradioactive in situ hybridisation in the pregnant rabbit endometrium.

Ann. Anat. **176**: 23-31

Kumar, V., Chambon, P. (1988)

The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer.

Cell **55**: 145-156

Liang, P., Pardee, A. B. (1992)

Differential display of eucaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction.

Science **257**: 967-971

Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., Pardee, A. B. (1993)

Differential display and cloning of messenger RNA from human breast cancer versus mammary epithelial cells.

Cancer Res. **52**: 6966-6968

Lefstin, J. A., Thomas, J. R., Yamamoto, K. R. (1994)

Influence of a steroid receptor DNA-binding domain on transcriptional regulatory functions.

Genes Dev. **8**, 2842-2856

Longacre, T. A., Bartow, S. A. (1986)

A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle.

Am. J. Surg. Pathol. **10**: 382-393

Matrisian, L. M., Gaire, M., Rodgers, W.H., Osteen, K. G. (1994)

Metalloproteinase expression and hormonal regulation during tissue remodeling in the cycling human endometrium.

Koide, H., Hayashi, T. (eds): Extracellular Matrix in the Kidney. Contrib. Nephrol. pp 94-100, Basel, Karger

Mendel, D. B., Bodwell, J. E., Gametchu, B., Harrison, R. W., Munck, A. (1986)

Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-kDa non-steroid-binding phosphoprotein that is lost on activation.

J. Biol. Chem. **261**: 3758-2763

Meyer, M.-E., Pornon, A., Ji, J., Bocquel, M.-T., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1990)

Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor.

EMBO J. **12**: 3923-3932

Michna, H., Nishino, Y., Neef, G., McGuire, W. L., Schneider, M. R. (1992)

Progesterone antagonists: Tumor-inhibiting potential and mechanism of action.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol. **41**: 339-348

Miner, J. N., Diamond, M. I., Yamamoto, K. R. (1991)

Joints in the regulatory lattice: composite regulation by steroid receptor-AP1 complexes.

Cell Growth Diff. **2**: 525-530

Mordacq, J. C., Linzer, D. I. H. (1989)

Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression.

Genes Dev. **3**: 760-769

Mueller, P.R., Wold, B. (1989)

In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR.

Science **246**: 780-786

Neef, G., Beier, S., Elger, W., Henderson, D., Wiechert, R. (1984)

New steroids with antiprogestational and antiglucocorticoid activities.

Steroids **44**: 349-372

Newell, K., Witty, J., Rodgers, W. H., Matrisian, L. M. (1994)

Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis.

Mol. Carcinog. **10**: 199-206

O`Grady, R., Upfold, L. I., Stephens, R. W. (1981)

Rat mammary carcinoma cells secrete active collagenase and activate latent enzyme in the stroma via plasminogen activator.

Int. J. Cancer **28**: 509-515

Ohara-Nemoto, Y., Strömstedt, P. E., Dahlman-Wright, K., Nemoto, T., Gustafsson, J-Å., Carlstedt-Duke, J. (1990)

The steroid binding properties of recombinant glucocorticoid receptor: a putative role for heat shock protein hsp 90.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **37**: 481-490

Orti, E., Hu, L. M., Munck, A. (1993)

Kinetics of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact cells. Evidence for hormone-induced hyperphosphorylation after activation and recycling of hyperphosphorylated receptors.

J. Biol. Chem. **268**: 7779-7784

Orti, E., Mendel, D. B., Smith, L. I., Munck, A. (1989)

Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells.

J. Biol. Chem. **264**: 9728-9731

Perrot-Appianat, M., Logeat, F., Groeyer-Picard, M. T., Milgrom, E. (1985)

Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies.

Endocrinol. **116**: 1473-1484

Pfahl, M. (1993)

Nuclear receptor/AP-I interaction.

Endoc. Rev. **14**: 651-658

Philibert, D., Costerousse, G., Gaillard-Moguilewsky, M., Ndelec, L., Nique, F., Tournemine, C., Teutsch, G. (1991)

From RU 38486 towards dissociated antiglucocorticoid and antiprogestosterone.

Agarwal, M. K. (ed.), Karger, Basel, vol.19: 1-17

Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M. J., Fortin, M. G., Lindquist, S., Yamamoto, K. R. (1990)

Reduced levels of hsp 90 compromise steroid receptor action *in vivo*.

Nature **348**: 166-168

Picard, D., Yamamoto, K. R. (1987)

Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor.
EMBO J. **6**: 3333-3340

Puri, C. P., Van Look, P. F. A. (1991)

Newly developed competitive progesterone antagonists for fertility control.
Agarwal, M. K. (ed.) Karger, Basel vol. **19**: 127-167

Rao, G.S. (1981)

Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells.
Mol. Cell. Endocrinol. **21**: 97-108

Reed, W., Erikstein, B. K., Funderud, S., Lilleng, R., Tvedt, K., Nesland, J. M. (1993)

CDw75 antigen expression in breast lesions.
Pathol. Res. Pract. **189**: 394-398

Riegel, A. T., Lu, Y., Remenick, J., Wolford, R. G., Berard, D. S., Hagar, G. L. (1991)

Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription.
Mol. Endocrinol. **5**: 1973-1982

Rodgers, W. H., Osteen, K. G., Matrisian, L. M., Navre, M., Giudice, L. C., Gorstein, F. (1993)

Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle.
Am. J. Obstet. Gynecol. **168**: 253-260

Rodgers, W. H., Matrisian, L. M., Giudice, L. C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F., Osteen, K. (1994)

Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones.
J. Clin. Invest. **94**: 946-953

Saatcioglu, F., Deng, T., Karin, M. (1993)

A novel cis element mediating ligand independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation.
Cell **75**: 1095-1105

Saatcioglu, F., Claret, F.-C., Karin, M. (1994)

Negative transcriptional regulation by nuclear receptors.

Cancer Biology 5: 347-359

Sambrook; J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual.

Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanchez, E. R., Hirst, M., Scherrer, L. C., Tang, H.-Y., Welsh, M. J., Harmon, J. M., Simons, S. S., Ringold, G. M., Pratt, W. B. (1990)

Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp 70 and hsp 90.

J. Biol. Chem. 265: 20123-20130

Schneider, M. R. (1993)

Antihormone: Von der Entdeckung der Steroidhormone zu spezifischen Krebstherapeutika.

Arch. Pharm. 326: 769-784

Schreiber, J. R., Hsueh, A. J. W., Baulieu, E. E. (1983)

Binding of the antiprogestin RU486 to rat ovary steroid receptors.

Contraception 28: 77-85

Schweg C., Klotzbücher, M., Sachs, M., Ulber, V., Klein-Hitpass, L. (1995)

Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with TAF_{II} 110 subunit of the TFIID complex.

J. Biol. Chem. 270: 21331-21338

Simons, S. S., Oshima, H., Szapary, D. (1992)

Higher levels of control: Modulation of steroid hormone-regulated gene transcription.

Mol. Endocrinol. 6: 995-1002

Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T. C., Tenen, D. G., Danna K. J. (1995)

Overcoming limitations of the mRNA differential display technique.

Nuc. Acids Res. 23: 4738-4739

Strömstedt, P.-E., Berkenstam, A., Jörnvall, H., Gustafsson, J.-Å., Carlstedt-Duke, J. (1990)

Radiosequence analysis of the human progesterin receptor charged with ^3H -promesterone: a comparison with the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem. **265**: 12973-12977

Teurich, S., Angel, P. (1995)

The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1 regulated promoters lacking GR binding sites.

Chemical Senses **20**: 251-255

Trainer, P. J., Besser, G. M. (1991)

The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's Syndrome.

Clin. Endocrin. **34**: 317-330

Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J.-Å., Tsai, M.-J., O'Malley, B. W. (1988)

Molecular interactions of steroid hormone receptors with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation.

Cell **55**: 5002-5006

Ucker, D. S. (1987)

Cytotoxic T lymphocytes and glucocorticoids activate an endogenous suicide process in target cells.

Nature **327**: 62-64

Vandamme, V., Pierce, A., Verbert, A., Delannoy, P. (1993)

Transcriptional induction of β -galactoside-2,6-sialyltransferase in rat fibroblasts by dexamethasone.

Eur. J. Biochem. **211**: 135-140

Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M.-J., McDonnall, D. P., O'Malley B. W. (1992)

The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor.

Cell **69**: 703-713

Wade, E. J., Heck, S., Cato, A. C. B. (1995)

Glucocorticoid receptor-activator protein-I interactions in drug design.

Biochem. Soc. Trans. **23**: 946-952

Wehle, H., Moll, J., Cato, A. C. B. (1995)

Molecular identification of steroid analogs with dissociated antiprogestin activities.

Steroids **60**: 368-374

Wilkström, A.-C., Bakke, O., Okret, S., Brönnegard, M., Gustafsson, J.-Å. (1987)

Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization.

Endocrinol. **120**: 1232-1242

Wyllie, A. H. (1980)

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.

Nature **284**: 555-556

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M. (1976)

Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription.

Ann. Rev. Biochem. **45**: 721-746

Yang, N. N., Venugopalan, M., Hardikar, S., Glasebrook, A. (1996)

Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene.

Science **273**: 1222-1225

Zimmermann, J. W., Schultz, R. M. (1994)

Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display.

Proc. Natl.Acad.Sci. **91**: 5456-5460