

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6494

Struktur und subzelluläre Lokalisierung des Androgenrezeptors
mit verlängerter Glutaminsequenz aus Patienten mit spinaler und
bulbärer Muskelatrophie

Matthias Becker

Institut für Toxikologie und Genetik

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

Struktur und subzelluläre Lokalisierung des Androgenrezeptors mit verlängerter Glutaminsequenz aus Patienten mit spinaler und bulbärer Muskelatrophie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe
genehmigte
DISSERTATION

von

Matthias Becker

aus
Weingarten/Baden

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2000

Referent: Priv. -Doz. Dr. Andrew C. B. Cato

1. Korreferent: Prof. Dr. P. Herrlich

2. Korreferent: Prof. Dr. H. Klocker

Zusammenfassung

Spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA; auch als Kennedykrankheit bekannt) ist eine neurodegenerative Krankheit, die auf der Amplifikation einer CAG-Triplettsequenz im kodierenden Bereich des Androgenrezeptor (AR) Gens zurückzuführen ist. Der mutierte Rezeptor wird in verschiedenen Gehirnbereichen exprimiert auch in Bereichen, die nicht von der Krankheit betroffen sind. Dies deutet darauf hin, daß zelltypspezifische Faktoren für die pathogene Wirkung des mutierten Rezeptors benötigt werden.

In dieser Arbeit wurden AR Proteine mit unterschiedlich langen Glutamin (Q) Sequenzen im Aminoterminus untersucht (Q1, Q22 und Q77). Einerseits wurde ihre Fähigkeit überprüft, Faktoren aus Gehirnextrakten zu binden, andererseits wurden ihre physio-chemischen Eigenschaften in Zellkultur studiert. Das Ziel dieser Untersuchungen war, Eigenschaften zu charakterisieren, die für Rezeptoren mit verlängerter Glutaminsequenz spezifisch sind.

In einer Interaktionsstudie wurde unter Verwendung von immobilisierten Glutaminsequenzen nach Faktoren gesucht, die sequenzlängenspezifisch mit dem AR interagierten. Tubulin wurde als ausschließlich mit einer Glutaminsequenz der nicht pathogenen Länge (22 Glutaminreste) interagierender Faktor identifiziert. Die Spezifität der Interaktion wurde in Kosedimentationsexperimenten bestätigt. Der AR mit einer nicht pathogenen Homopolymerfolge von 22 Glutaminresten (ARQ22), nicht aber der AR mit einer pathogenen Sequenzlänge von 77 Glutaminresten (ARQ77) kosedimentierte mit Mikrotubuli. Auch die subzelluläre Lokalisierung des Rezeptors ist von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge im AR abhängig. Es wurde festgestellt, daß der nicht Hormon gebundene Rezeptor mit nur einem Glutaminrest im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptorvarianten mit 22 bzw. 77 Glutaminresten deutlich stärker nukleär lokalisiert war. Ebenso ist die Geschwindigkeit der durch Hormon induzierten Kerntranslokation mit der Länge der Glutaminsequenz negativ korreliert. Die Zerstörung der Mikrotubuli hatte keinen Einfluß auf diese hormoninduzierte Translokation der Rezeptoren mit unterschiedlich langen Glutaminhomopolymerfolgen. Ein Unterschied ergab sich jedoch für die hormonunabhängige Lokalisierung für den Rezeptor mit nur einem Glutaminrest (ARQ1).

Sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von Hormon wurden in transient transfizierten Zellen zytoplasmatische, den AR enthaltende Aggregate beobachtet. Allerdings war nur die hormoninduzierte Formierung von Aggregaten von der Länge der Glutaminsequenz abhängig. Der Rezeptor mit einer 77 Glutaminreste umfassenden Homopolymerfolge bildete große Aggregate in ungefähr 10 % der transfizierten Zellen. Der AR mit 22 Glutaminresten bildete kleinere Aggregate in großer Zahl in 10 % der Zellen. Der AR mit nur einem Glutaminrest bildete wenige kleine Aggregate in 5 % der Zellen.

Es gibt einige Hinweise darauf, daß die hormonabhängige Formierung von den AR enthaltenden Aggregaten mit dem Kerntransport des Rezeptors zusammenhängt. Erstens bilden Rezeptoren, von denen gezeigt werden kann, daß sie im Kerntransport verzögert sind größere Aggregate. Zweitens war die Aggregatbildung abhängig von der Zeit. Obwohl 3 Stunden nach Hormongabe Aggregate zu beobachten waren, waren sie 24 Stunden nach der Hormongabe nicht mehr nachzuweisen. Drittens hatte eine Verhinderung des nukleären Transports durch Deletion der Kernlokalisationsdomäne eine andauernde Präsenz von Aggregaten zur Folge. Die vom Q77 Rezeptor gebildeten Aggregate waren allerdings morphologisch von den durch andere Rezeptoren gebildeten Aggregaten zu unterscheiden. Folglich führt Amplifikation von Glutaminsequenzen im AR zu beeinträchtigtem Kerntransport und zu der Fähigkeit Aggregate einer bestimmten Morphologie zu bilden.

Structure and subcellular localisation of androgen receptor with prolonged glutamine sequence from patients with spinal and bulbar muscular atrophy

Abstract

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA; also known as Kennedy's disease) is a neurodegenerative disease caused by the amplification of a CAG-triplet sequence in the coding region of the androgen receptor (AR) gene. The mutated receptor is not only expressed in regions of the brain that are affected by the disease but also in unaffected areas. Therefore cell-type specific factors must be involved in the pathogenic action of the mutated receptor. In this study AR proteins only differing in the length of their glutamine (Q) sequence were studied (Q1, Q22 and Q77). Their ability to bind factors from mouse brain extracts and their physico-chemical properties were analysed. The aim of the work was to characterise properties that are unique for the receptor with a prolonged glutamine sequence. An interaction study using immobilised glutamine sequences was employed to identify factors that interact with the AR in a sequence specific manner. Tubulin was found to interact exclusively with the glutamine sequence of nonpathogenic length (22 glutamine residues). The specificity of the interaction was confirmed in a cosedimentation assay. The AR with the nonpathogenic sequence length of 22 glutamine residues (ARQ22) but not the AR with a pathogenic sequence length of 77 glutamine residues (ARQ77) coprecipitated with microtubules. Moreover the subcellular localisation of the receptor was found to depend on the length of the glutamine tract. The receptor with only one glutamine residue showed a much stronger nuclear localisation in the hormone free situation compared to the receptor variants with 22 or 77 glutamine residues. The speed of hormone induced nuclear translocation of the receptor was also found to be inversely correlated with the length of the glutamine sequence. The disruption of the microtubule cytoskeleton had no influence on the hormone induced translocation of the receptors with differing length of the glutamine stretch. However a difference in the hormone independent localisation of the receptor with only one glutamine residue could be observed. AR containing cytoplasmic aggregates were observed in absence and presence of hormone. Only the hormone induced formation of the aggregates was shown to be dependent on the length of the glutamine tract. The receptor containing 77 glutamine residues formed large aggregates in 10 % of the transfected cells. The AR with 22 glutamine residues formed numerous but qualitatively smaller aggregates in 10 % of the cells. The AR with only one glutamine residue formed fewer small aggregates in 5 % of the cells. Several lines of evidence point to the connection of the aggregate formation and the nuclear translocation of the receptor: 1) the receptors that showed a delay in nuclear transport formed bigger aggregates in a time dependent manner. 2) although the formation of aggregates was observed 3 hours after application of hormone they could not be observed after 24 hours. 3) the abrogation of nuclear transport by deletion of the receptor's nuclear localisation signal domain led to a permanent cytoplasmic localisation of receptors as aggregates. However the aggregates formed by the ARQ77 receptor were morphologically different from those formed by the other receptors. Thus the amplification of the glutamine sequence in the AR leads to a delayed nuclear transport and to the formation of specific aggregates.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Triplettinstabilität assoziierte Krankheiten	1
1.2	Mögliche Ursache der CAG-Triplettamplifikationskrankheiten	4
1.3	Polyglutamin vermittelte Protein-Interaktionen	5
1.3.1	Polyglutamin bindende Faktoren	5
1.3.2	Polyglutamin vermittelte Aggregatbildung	6
1.4	Die spinale und bulbäre Muskelatrophie: ein Modell für die Studie von Krankheiten, die durch Glutaminsequenzamplifikation entstehen	7
1.5	Der Androgenrezeptor	9
1.6	Systeme zur Analyse der amplifizierten Glutaminsequenz des Androgenrezeptors	11
1.7	Ziel der vorliegenden Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
Material		
2.1	Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Allgemein verwendete Lösungen	16
2.3	Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Amplifizierung der Glutaminhomopolymerfolge des menschlichen Androgenrezeptors	16
2.4	Plasmidkonstrukte	17
2.5	Enzyme	18
2.6	Antikörper	18
2.7	Zelllinien und Kulturbedingungen	20
2.8	Bakterien	20
Methoden		
2.9	Behandlung von Nukleinsäuren	21
2.10	DNA-Präparation	22
2.11	Klonierungstechniken	23
2.12	Transformation von Bakterien	25
2.13	Zellkultur	26
2.14	Transiente Transfektion	27
2.15	Immunfluoreszenznachweis des Androgenrezeptors	28
2.16	Allgemeine Methoden von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen	29

2.17	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen.....	32
2.18	Kosedimentationsexperiment (nach Vallee, 1982).....	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Der 1c2 Antikörper erkennt den Androgenrezeptor in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge.....	36
3.2	Ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa bindet ausschließlich an die 22mer Glutaminsequenz des Androgenrezeptors.....	38
3.3	Bei dem 50 kDa Protein handelt es sich um α -bzw. β -Tubulin.....	42
3.4	Interaktion des Androgenrezeptors mit Mikrotubuli.....	43
3.5	Der Einfluß der Glutaminsequenzlänge auf die Kosedimentation des Androgenrezeptors mit Mikrotubuli.....	45
3.6	Hormon abhängige und unabhängige Lokalisierung des Androgenrezeptors in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge.....	46
3.7	Lokalisierung des Androgenrezeptors in Abhängigkeit von Mikrotubuli.....	51
3.8	Bildung cytoplasmatischer Aggregate nach Hormoninduktion in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymersequenz des Androgenrezeptors.....	56
3.9	Die Verkürzung des Androgenrezeptors verhindert die Bildung cytoplasmatischer Aggregate.....	62
3.10	Bildung cytoplasmatischer Aggregate durch Mutanten des Androgenrezeptors, die in der Kerntranslokation defekt sind.....	65
3.11	Der Einfluß von Antihormonen auf die Bildung cytoplasmatischer Strukturen.....	72
3.11.1	Der Einfluß von Cyproteronacetat (CPA) als steroidisches Antihormon auf die nukleäre Translokation und die Bildung von cytoplasmatischen Aggregaten.....	73
3.11.2	Der Einfluß von nicht steroidischen Antiandrogenen auf die nukleäre Translokation und Aggregatbildung.....	75
4	Diskussion	79
4.1	Die erhöhte Affinität des 1c2 Antikörpers zu dem Glutaminsequenz amplifizierten Androgenrezeptor als ein Indiz für geänderte strukturelle Eigenschaften.....	79
4.2	Interaktion der Glutaminsequenzsonden mit Tubulin.....	80
4.3	Hormon abhängige Translokationsgeschwindigkeit des Androgenrezeptors mit unterschiedlich langer Glutaminsequenz.....	83
4.4	Bildung unterschiedlicher cytoplasmatischer Aggregate durch den Androgenrezeptor.....	84

Abkürzungen.....	89
Appendix.....	91
Literatur.....	93

1 Einleitung

1.1 Tripletinstabilität assoziierte Krankheiten

Neurodegenerative Erbkrankheiten wie das Veitzanzsyndrom (Chorea Huntington) oder die X-Chromosom-gebundene spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA, auch als Kennedykrankheit bezeichnet) haben gemeinsam, daß sie durch die Amplifikation einer DNA-Triplettsequenz ausgelöst werden. Abhängig von den verschiedenen Krankheiten handelt es sich dabei um die Amplifikation unterschiedlicher Triplettsequenzen wie z.B. einer AGC, CAG, CTG, CGG oder GAA-Sequenz. Dabei kann die betroffene Sequenz sowohl im kodierenden als auch im nicht kodierenden Bereich eines Gens lokalisiert sein.

Alle Erkrankungen, die durch diese Mutationen ausgelöst werden sind durch gemeinsame Merkmale gekennzeichnet. So kommt es in ihrem Verlauf zu der Ausprägung eines meist neurodegenerativen Phänotyps. Längere Sequenzamplifikationen sind mit einem früheren Ausbruch der jeweiligen Krankheit, einem dramatischeren Krankheitsverlauf und einem stärker ausgeprägten Phänotyp korreliert. Ein weiteres markantes Merkmal dieser Krankheiten ist das Phänomen der Antizipation. Es handelt sich hierbei um die von Generation zu Generation immer frühere Manifestation des pathogenen Phänotyps (zur Übersicht Klockgether und Evert, 1998). Der molekulare Mechanismus, der nach Triplettamplifikation zu der Entstehung eines pathogenen Phänotyps führt, ist weitgehend nicht verstanden. Bei einem Teil der Erkrankungen befindet sich die Triplettsequenz außerhalb des kodierenden Bereiches des betroffenen Gens. In diesen Fällen führt die Sequenzamplifikation zum Verlust der Expression (und damit auch zum Verlust der Funktion) des jeweiligen Gens (Klockgether und Dichgans 1997, Hardy und Gwinn-Hardy, 1998). Dieser Mechanismus ist für das Fragile-X-Syndrom, die myotonische Dystrophie (DM) und die Friedenreich's Ataxie beschrieben (Fu *et al.*, 1991, Verkerk *et al.*, 1991, Caskey *et al.*, 1992, Campuzano *et al.*, 1996, Hardy und Gwinn-Hardy, 1998). Die Länge der Triplettsequenzen kann bei diesen Krankheiten dramatische Ausmaße annehmen. Im Fall von DM erreicht die Verlängerung der AGC-Triplettsequenz im Myotonin

Proteinkinase-Gen (PT-PK-Gen) u.U. weit über 4000 Wiederholungen, während die normale Länge im Bereich von 50 Triplets liegt. Anders verhält es sich mit Krankheiten, die durch Amplifikation einer CAG-Triplettsequenz im kodierenden Bereich des jeweiligen Gens ausgelöst werden. Die Länge der CAG-Sequenzen liegt bei diesen Krankheiten bei maximal 200 Wiederholungen (Tab. 1). Bis zum heutigen Tag sind acht neurodegenerative Krankheiten identifiziert, die durch die CAG-Sequenzamplifikation ausgelöst werden.

Tabelle 1: Übersicht zu Polyglutaminkrankheiten

Krankheit	Protein	Länge der pathogenen Glutaminsequenz	Vorkommen von Aggregaten
HD	Huntingtin	38-180	NI, dystrophische Neurite, cytoplasmatische Aggregate
DRPLA	Atrophin	48-88	NI
SBMA	Androgen- rezeptor	38-62	NI, cytoplasmatische Aggregate
SCA-1	Ataxin-1	39-83	NI
SCA-2	Ataxin-2	34-59	?
SCA-3/MJD	Ataxin-3	55-84	NI
SCA-6	Kalziumkanal	21-30	cytoplasmatische Aggregate
SCA-7	Ataxin-7	34-200	NI

Tabelle nach Paulson *et al.*, 1999, abgeändert. Die Referenzen für die angegebenen Daten sind wie folgt: DiFiglia *et al.*, 1997, Becher *et al.*, 1998, Holmberg *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1998, Huynh *et al.*, 1999, Ishikawa *et al.*, 1999, Li *et al.*, 1999.

Es handelt sich dabei um die X-Chromosom-gebundene spinobulbäre Muskelatrophie, die Chorea Huntington, die dentatorubrale und pallidolystische Atrophie (DRPLA) und spinocerebellare Ataxien (SCA) Typ 1, 2, 3, 6 und 7 (La Spada *et al.*, 1991, The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993, Orr *et al.*, 1993, Kawaguchi *et al.*, 1994, Imbert *et al.*, 1996, Chung *et al.*, 1993). Die von der Sequenzamplifikation betroffenen Gene weisen

bis auf die Triplettssequenz selbst keine weiteren Homologien auf. Die CAG-Triplettssequenz kodiert für eine Glutaminhomopolymerfolge im exprimierten Protein. Die Funktion der einzelnen Genprodukte ist weitgehend unbekannt. Die zwei am besten charakterisierten Proteine sind der Androgenrezeptor (AR) als Träger der Glutaminsequenzamplifikation bei SBMA und der α_{1A} -spannungsabhängige Kalziumkanal, der bei SCA-6 von der Amplifikation betroffen ist (La Spada *et al.*, 1991, Zhuchenko *et al.*, 1997, Tab. 1). Mittlerweile sind die anderen Triplettsamplifikation betroffenen Gene identifiziert. Über die Funktion der Genprodukte ist allerdings nur sehr wenig bekannt. So weiß man z.B. über das Chorea Huntington Genprodukt Huntingtin nur, daß es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 348 kDa handelt. Möglicherweise ist seine Funktion mit dem Transport von Vesikeln assoziiert (DiFiglia *et al.*, 1995, Gutekunst *et al.*, 1995). Mit einer Häufigkeit von 4 Erkrankten unter 100.000 Europäern ist die Chorea Huntington die am häufigsten auftretende durch Amplifikation einer CAG-Triplettssequenz ausgelöste Krankheit (Perutz, 1999). Obwohl die meisten von der CAG-Sequenzamplifikation betroffenen Gene nicht spezifisch im Gehirn exprimiert werden, kommt es im Verlauf der unterschiedlichen Krankheiten selektiv zum Absterben bestimmter Neuronenpopulationen in unterschiedlichen Gehirnbereichen. So sind z.B. Huntingtin und das SCA-1 Genprodukt Ataxin 1 in peripherem Gewebe und in vielen Bereichen des Gehirns exprimiert. Im Verlauf der Chorea Huntington kommt es jedoch hauptsächlich zum Absterben neuronaler Zellen in Caudatum, Putamen sowie im cerebralen Cortex und einigen Nuklei des Zwischen- und Mittelhirns. Bei SCA-1 ist hauptsächlich in den Purkinje Zellen des cerebellaren Cortex und im Pons der Verlust neuronaler Zellen zu beobachten.

1.2 Mögliche Ursache der CAG-Triplettamplifikationskrankheiten

Mit einer, im Vergleich zu den anderen durch Triplettamplifikation ausgelösten Krankheiten, wesentlich geringeren pathogenen Sequenzlänge (21-30 Glutaminreste; Tab.1) im α_{1A} -spannungsabhängigen Kalziumkanal stellt die spinocerebellare Ataxie Typ 6 (SCA-6) eine Ausnahme dar. Der Phänotyp dieser Krankheit weist Ähnlichkeiten mit zwei weiteren neurodegenerativen Krankheiten auf (familiäre hemiplegische Migräne, episodische Ataxie Typ 2; zur Übersicht Miller, 1997). Diese sind auf einen durch Punktmutationen im Gen des α_{1A} -spannungsabhängigen Kalziumkanals verursachten Funktionsverlust zurückzuführen. Man nimmt daher an, daß es ebenfalls eine Funktionsbeeinträchtigung ist, die nach Verlängerung der Glutaminsequenz zur Ausprägung von SCA-6 führt (Paulson, 1999, Jodice *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu gilt ein toxischer Funktionsgewinn als Ursache für die anderen durch CAG-Triplettamplifikation ausgelösten Krankheiten. Die Hinweise für einen toxischen Funktionsgewinn sind indirekter Natur und gründen zunächst auf der Beobachtung, daß alle von der CAG-Triplettamplifikation betroffenen Gene in den betroffenen Geweben exprimiert werden. Weiterhin zeigen Individuen mit einer Deletion des HD bzw. AR Gens keine Symptome der Chorea Huntington bzw. von SBMA (Quigley *et al.*, 1992, Gusella *et al.*, 1985). Ebenso zeigten Mäuse mit gezielter Deletion des HD Gens keine Symptome der Chorea Huntington. Während es also Hinweise für eine erworbene Funktion als Ursache der durch CAG/Glutaminsequenzamplifikation verursachten Krankheiten gibt, ist der molekulare Mechanismus, der zum Ausbruch der Krankheiten führt, weitgehend ungeklärt. Die Tatsache, daß sich die CAG-Sequenz im kodierenden Bereich der betroffenen Gene befindet, bedeutet, daß entweder deren RNA oder aber das translatierte Protein den toxischen Effekt vermitteln. Ein toxischer Effekt der RNA ist nicht auszuschließen, da ein RNA bindendes Protein identifiziert wurde, das mit der Huntingtin-RNA CAG-sequenzlängenspezifisch interagiert (McLaughlin *et al.*, 1996). Kürzlich durchgeführte Studien beschrieben jedoch die Veränderung struktureller Eigenschaften des Proteins durch die Verlängerung der Glutaminsequenz. Es wurde postuliert, daß diese Veränderung die Ursache für die Toxizität der betroffenen Proteine darstellt (Perutz *et al.*, 1994). Die strukturellen Änderungen der verlängerten

Polyglutaminsequenzen wurden durch das Bindeverhalten eines Antikörpers (1c2 Antikörper, (Trottier *et al.*, 1995) demonstriert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an verlängerte Glutaminsequenzen. Aus der beobachteten strukturellen Änderung könnte eine veränderte Interaktion der von einer Glutaminsequenzamplifikation betroffenen Proteine mit weiteren Faktoren folgen.

1.3 Polyglutaminvermittelte Proteininteraktionen

1.3.1 Polyglutaminbindende Faktoren

Tatsächlich wurden mehrere Faktoren isoliert, deren Bindungsintensität durch die Länge der Glutaminsequenz im jeweils interagierenden Protein moduliert wurde. So wurde z.B. HAP-1 in einem Zweihybrid System als spezifisch mit Huntingtin interagierendes Protein identifiziert. Die Verlängerung der Glutaminsequenz im Huntingtin bewirkte eine intensivere Bindung des HAP-1 Proteins (Li *et al.*, 1995). Neben einer verstärkten Bindung kann die Verlängerung der Glutaminsequenz aber auch zu einer verminderten Bindungsaktivität von Faktoren führen. So wurde ebenfalls in einem Zweihybrid System der Importfaktor Ran als mit dem Androgenrezeptor interagierendes Protein identifiziert. Die Interaktion wurde aber durch die Verlängerung der Glutaminsequenz stark beeinträchtigt (Hsiao *et al.*, 1999). Die bisher identifizierten Faktoren kolokalisieren jedoch mit den Polyglutaminproteinen nicht ausschließlich in Geweben, die im Verlauf der jeweiligen Krankheit betroffen sind. Dies bedeutet, daß weitere differenziell interagierende Faktoren an der Zelltyp spezifischen Pathogenese beteiligt sein müssen.

1.3.2 Polyglutaminvermittelte Aggregatbildung

Für eine geänderte Protein-Protein Interaktion in Folge der Glutaminsequenzverlängerung spricht ebenfalls die Beobachtung, daß amino-(N)-terminale Fragmente des Huntingtin mit pathogener Glutaminsequenzlänge *in vitro* und *in vivo* amyloid ähnliche Aggregate formten. Die Aggregation wurde dabei als selbst getriebener Prozeß beschrieben (Scherzinger *et al.*, 1997). Die Bildung von Aggregaten durch Polyglutaminsequenzen enthaltende Proteine ist aber nicht nur durch einen selbst getriebenen Prozeß möglich. So können Polyglutaminsequenzen in ihrem Proteinkontext durch Transglutaminasen irreversibel aneinander gebunden werden (Kahlem *et al.*, 1996). Möglicherweise stellen verlängerte Polyglutaminsequenzen bessere Substrate für das Enzym dar (Green *et al.*, 1996). Unterschiedliche Formen der Aggregatbildung sind für die meisten Polyglutaminkrankheiten in unterschiedlichen Systemen beschrieben. Es handelt sich dabei um runde bis fibrilläre Strukturen. In Abhängigkeit von dem gewählten System wurden sowohl cytoplasmatische Aggregate als auch intranukleäre Aggregate, die sogenannten intranukleären Inklusionen (NI's), beschrieben. Intranukleäre Inklusionen sind durch Polyubiquitinierung und ihre elektronendichte Struktur charakterisiert (Davies *et al.*, 1997). Sie sind mittlerweile als gemeinsames Merkmal in unterschiedlichen Tiermodellen und in Patientenstudien für die meisten Glutaminsequenzkrankheiten beschrieben (Übersicht in Hardy und Gwinn-Hardy, 1998, Klockgether und Evert, 1998, Kim und Tanzi, 1998, Ross, 1997, Tabelle 1). Cytoplasmatische Aggregate wurden in Histologischen Studien von HD und SCA-6 Gehirnen gefunden. Darüber hinaus wurde in Zellsystemen eine gesteigerte hormoninduzierte Bildung cytoplasmatischer Aggregate durch den AR mit verlängerter Glutaminsequenz beschrieben (Stenoien *et al.*, 1999). Zytoplasmatische Aggregate konnten ebenfalls nach Überexpression glutaminsequenzamplifizierter Proteinfragmente des Huntingtin, Ataxin-3 und des Androgenrezeptors in unterschiedlichen Zellsystemen beobachtet werden (Martindale *et al.*, 1998, Ikeda *et al.*, 1996, Merry *et al.*, 1998). Aus der beobachteten unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung der Aggregate folgte die Frage nach dem Ort der toxischen Wirkung von Polyglutaminproteinen. Die hierzu angefertigten Studien gelangten zu teilweise

widersprüchlichen Ergebnissen. Saudou *et al.*, (1998) und Klement *et al.*, (1998) beschrieben in einem Zellsystem für die Chorea Huntington bzw. einem transgenen Tiermodell für die spinocerebellare Ataxie Typ 1 (SCA-1) die Lokalisierung des Huntingtin bzw. Ataxin-1 im Nukleus als notwendig und hinreichend für den durch sie bewirkten neuronalen Zelltod. Beide Studien gelangten darüber hinaus zu dem Ergebnis, daß das Vorhandensein nukleärer Inklusionen nicht für das Absterben neuronaler Zellen verantwortlich ist. In einer weiteren transgenen Studie wurde gezeigt, daß eine im Cytoplasma lokalisierte toxische Wirkung des Glutaminsequenz modifizierten Huntingtin der proteolytischen Aufspaltung und subsequenten Lokalisierung N-terminaler Huntingtinfragmente im Nukleus vorausging (Hodgson *et al.*, 1999). Darüber hinaus definierte eine Studie den Kern und das Cytoplasma als Orte cytotoxischer Wirkung von Huntingtin (Hackam *et al.*, 1999). Trotz der vielen unterschiedlichen, aus der Arbeit mit Glutaminsequenzamplifizierten Proteinen, erhaltenen Ergebnisse ist ihre Rolle bei der Entstehung der unterschiedlichen Krankheiten noch weitgehend ungeklärt. Eine der am intensivsten studierten Krankheiten ist die spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA).

1.4 Die spinale und bulbäre Muskelatrophie: ein Modell für die Studie von Krankheiten, die durch Glutaminsequenzamplifikation entstehen

Die Symptome der Krankheit wurden als langsamer neurogener Schwund der proximalen Muskulatur, des Schultergürtels und der oberen und unteren Extremitäten beschrieben (Sobue *et al.*, 1989). Zusätzlich kann die Atemmuskulatur in Mitleidenschaft gezogen sein. Patienten sterben häufig an Komplikationen, die in diesem Bereich auftreten. Neben den Motoneuronen degenerieren ebenfalls sensorische Neuronen, so daß bei SBMA Patienten häufig auch sensorische Defizite auftreten. Die Krankheit kann, muß aber nicht, mit einer milden Form von Gynäkomastie (Vergrößerung der Brustdrüsen beim Mann), Oligo- oder Azoospermie (Spermien mit keiner bzw. eingeschränkter Beweglichkeit) einhergehen. Die bei

Patienten gemessenen Serumtestosteronspiegel sind aber normal bis leicht erhöht. Neuropathologische Studien zeigten, daß es im Verlauf von SBMA zu dem Verlust neuronaler Zellen im Bereich des anterioren Rückenmarkhorns und motoneuronaler Nuklei im Gehirnstamm kommt (Abb. 1).

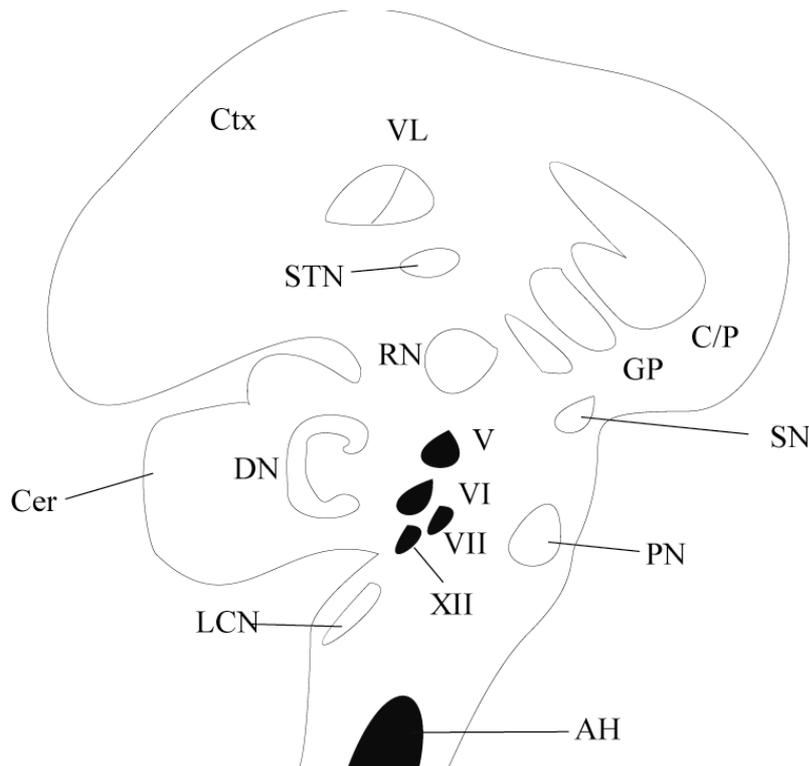


Abb. 1 Schematische Darstellung der Stellen neuronalen Zelltods bei SBMA. Nur in den schwarz ausgefüllten Bereichen kommt es zu starkem oder selektivem Zellverlust. AH, anteriores Horn; Cer, Cerebraler Cortex; C/P, Caudatum/Putamen; Ctx, Cortex des Cerebellums; DN Nucleus dentatus; GP, Globus pallidus; LCN Nucleus cuneate lateralis; PN, Pons; RN, Nucleus ruber; SN Substantia nigra; STN Nucleus subthalamicus; VL Nucleus ventralis lateralis; V,VI,VII und XII, Craniale Motornuclei. (geändert, nach Ross, 1995).

SBMA wurde als X-Chromosom gebundene Krankheit beschrieben (Kennedy *et al.*, 1968). In darauf folgenden Studien wurde das Krankheitsgen im proximalen Arm des X-Chromosoms in der Gegend, in der auch der AR kodiert ist, lokalisiert (Migeon *et al.*, 1981, Brown *et al.*,

1989). Dieser Befund, in Verbindung mit der Tatsache, daß SBMA mit einer milden Form von Androgeninsensitivität assoziiert ist, führte dann zu der Identifikation der CAG Tripletamplifikation in der kodierenden Region des AR als krankheitsauslösende Mutation (La Spada *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu den anderen durch Amplifikation einer Glutaminsequenz hervorgerufenen Krankheiten gilt SBMA als X-Chromosom gebundene rezessive Krankheit. Allerdings wurde auch bei Frauen mit einer Verlängerung der CAG-Triplettsequenz des AR im pathogenen Bereich milde klinische Symptome der Krankheit festgestellt (Ferlini *et al.*, 1995). Ein X-Chromosom gebundener dominanter Mechanismus, der zu SBMA führt, kann also nicht ausgeschlossen werden. Die normale Länge der Triplettfolge liegt in einem Bereich von 11 bis 35 Wiederholungen. Eine Verlängerung von 40 bis 62 CAG-Triplets ist in Patienten nachgewiesen (Tab. 1).

Für das Verständnis der Konsequenzen, die sich aus einer Polyglutaminsequenzverlängerung im AR Protein für eine Zelle ergeben, ist die Kenntnis des AR Proteins selbst und dessen Funktion eine wichtige Voraussetzung.

1.5 Der Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor zählt zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren, der neben dem AR, der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR), der Glucocorticoidrezeptor (GR), der Mineralocorticoidrezeptor (MR), der Thyroidhormonrezeptor (TR), der Retinsäurerezeptor (RAR), der 9-cis Retinsäurerezeptor (RXR) und der Vitamin D₃ Rezeptor (VDR) angehören. Diese Rezeptoren interagieren durch einen ligandenabhängigen Mechanismus mit spezifischen DNA-Sequenzen und regulieren so die Transkription von Zielgenen (Evans, 1988, Green und Chambon, 1988, Truss und Beato, 1993). Neben der klassischen Wirkung als Transkriptionsfaktor sind für Steroidrezeptoren noch weitere Funktionen beschrieben. Wie z.B. die negative Regulation der Genexpression über Proteininteraktion (Schneikert *et al.* 1996) oder die Aktivierung von MAP-Kinasen durch den AR und den ER (Peterziel *et al.*, 1999, DiDomenico *et al.*, 1996). Als gemeinsames Merkmal

zeichnen sich Steroidhormonrezeptoren durch ihren modulären Aufbau aus. Es handelt sich hierbei um eine amino (N)-terminale Transaktivierungsregion, eine zentral gelegene DNA-Bindedomäne und eine carboxy-(C)-terminale Ligandenbindedomäne. Die Ligandenbindedomäne (LBD) und die DNA-Bindedomäne (DBD) sind unter den nukleären Rezeptoren gut konserviert. Die DBD enthält neun Cysteinreste, wovon acht Zink-Ionen in zwei getrennten Zinkfingerstrukturen komplexieren. Diese Strukturen binden DNA an speziellen Kontaktstellen, den sogenannten Hormon responsiven Elementen (HRE). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des AR und seiner Subdomänen. Die wenig konservierte N-terminale Domäne, welche die wichtigste Transaktivierungsfunktion (TAF, Simental *et al.*, 1991, Jenster *et al.*, 1991, Palvimo *et al.*, 1993) vermittelt, nimmt mehr als die Hälfte des AR-Proteins ein. Direkt an die DBD schließt die sogenannte *hinge*-Region an. Sie kodiert unter anderem für die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS), welche den Transfer des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern vermittelt (Simental *et al.*, 1991, Jenster *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1994). Die hoch affine Ligandenbindung erfolgt an der Hormonbindedomäne.



Abb. 2 Domänenstruktur des humanen AR. Das humane AR Protein [919 Aminosäuren (Faber *et al.*, 1989)] besteht wie die anderen Mitglieder der Steroidrezeptor Familie aus einer N-terminalen Transkriptions Regulations Domäne (TAF, Aminosäuren 144 - 338), einer zentralen DNA-Binde – und Dimerisierungsdomäne (DBD, Aminosäuren 548 – 614) und einer C-terminalen Hormonbindedomäne (HBD, Aminosäuren 662 – 919). Die Polyglutaminhomopolymerfolge ist mit “Q“ bezeichnet. Die *hinge*-Region ist mit “h“ bezeichnet.

Nach seiner Synthese liegt der AR als nicht Liganden gebundener Rezeptor (Aporezeptor) im Cytoplasma komplexiert mit Hitzeschockproteinen (Hsp) vor. Es sind wahrscheinlich noch nicht alle Mitglieder dieses Komplexes identifiziert. Als sicher daran beteiligt gelten Hsp90,

Hsp70, Hsp56 ebenso p23 und Hsp40 (Veldscholte *et al.*, 1992, Caplan *et al.*, 1995, zur Übersicht Bohen *et al.*, 1995). Die LBD des Rezeptors stellt die Bindestelle für Hsp 90 dar (Housley *et al.*, 1990, Simental *et al.*, 1991, Smith und Toft, 1993). Der Aporezeptorkomplex hält den Rezeptor in einer Konformation, die Hormonbindung erlaubt. AR Mutanten, die um die Ligandenbindedomäne verkürzt wurden und also weder Hormon noch Hsp 90 binden, sind konstitutiv aktiv. Dies bedeutet wiederum, daß der Aporezeptorkomplex den Rezeptor nicht nur in einer für Ligandenbindung kompetenten sondern auch in einer transkriptionell inaktiven Konformation hält. Nach Hormonbindung dissoziiert der AR vom Aporezeptorkomplex, transloziert in den Kern und bindet dort durch seine Zinkfingerdomäne als Dimer an DNA. Das AR Protein kann dann als transkriptioneller Aktivator agieren. Die transkriptionelle Aktivierung wird über die Bindung von weiteren Proteinen, sogenannten Coaktivatoren, vermittelt (zur Übersicht Hibata *et al.*, 1997).

1.6 Systeme zur Analyse der amplifizierten Glutaminsequenz des Androgenrezeptors

Trotz mehrfachen unabhängig von einander durchgeführten Versuchen gelang es bisher nicht ein transgenes Tiermodell von SBMA zu erzeugen (Bingham *et al.*, 1995, Merry *et al.*, 1996, LaSpada *et al.*, 1998). Das Scheitern der Tiermodelle führt man entweder auf zu geringe Mengen an exprimiertem glutaminamplifizierten Rezeptor oder aber auf zu kurze Glutaminsequenzen in den transgen exprimierten Rezeptoren zurück (Merry und Fischbeck, 1998). Aus diesem Grund wurde der mutierte Rezeptor bisher nur in Zellkultursystemen und anhand von Patientenmaterial analysiert. Unterschiedliche Autoren berichten über einen teilweisen Funktionsverlust des von der Glutaminsequenz betroffenen Rezeptors. So beschrieb eine Studie eine verminderte Hormonaffinität des glutaminsequenzamplifizierten AR (MacLean *et al.*, 1995). In verschiedenen Patientenstudien wurde außerdem eine Reduktion der Rezeptormenge gefunden (Warner *et al.*, 1992, Danek *et al.*, 1994). Weiterhin wurde eine verminderte Expression der mutierten Androgenrezeptor mRNA im Rückenmark von SBMA

Patienten beschrieben (Nakamura *et al.*, 1994). Andere Studien befaßten sich mit der Transaktivierungskapazität des SBMA Rezeptors. Hier zeigten sich Unterschiede im Bezug auf die Transaktivierungseigenschaften in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge des Rezeptors (Chamberlain *et al.*, 1994, Mhatre *et al.*, 1993, Nakajama *et al.*, 1996, Kazemi *et al.*, 1995). Praktisch alle diese Ergebnisse wurden durch Studien anderer Arbeitsgruppen in Frage gestellt. Dies gilt für die reduzierte Hormonbindung, die reduzierten Proteinmengen und das geänderte Transaktivierungspotential des mutierten Rezeptors. So konnte in Patientenstudien keine verminderte Hormonaffinität des glutaminamplifizierten Rezeptors festgestellt werden (Warner *et al.*, 1992, Danek *et al.*, 1994). Ebenso wurde die Proteinmenge des SBMA Rezeptors als konstant beschrieben (Neuschmid-Kaspar *et al.*, 1996). Auch der Befund über die veränderte Transaktivierungskapazität in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Neuschmid-Kasspar *et al.*, 1995, Brooks *et al.*, 1997, Choong *et al.*, 1996). Die divergierenden Ergebnisse könnten auf die Verwendung unterschiedlicher Androgenrezeptorkonstrukte mit unterschiedlich langen Glutaminsequenzen zurückzuführen sein. Möglicherweise reicht eine relativ geringe Glutaminsequenzamplifikation von 45 Glutaminresten in einem Zellkultursystem nicht aus, um einen Effekt zu produzieren, der sich bei einem Rezeptor mit einer wesentlich längeren Glutaminsequenz von z.B. 77 Glutaminresten zeigt. Obwohl beide Glutaminsequenzen in einem Individuum krankheitsauslösend wären. Wobei mit einem dramatischeren Krankheitsverlauf bei Patienten mit einer Sequenzlänge von 77 Glutaminresten gegenüber denen mit einer Sequenzlänge von 45 Glutaminresten im AR zu rechnen wäre.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die bisher zu SBMA durchgeführten Versuche in unterschiedlichen Systemen beschäftigten sich hauptsächlich mit der Beobachtung einer durch den Rezeptor verursachten Veränderung der normalen Rezeptorfunktion in Patienten oder im Zellsystem. Es ergaben sich bis jetzt keine Hinweis auf die zelltypspezifischen molekularen Mechanismen, die zu der Entstehung der Krankheit beitragen. Die Tatsache, daß viele der von Glutaminamplifikation betroffenen Proteine in unterschiedlichen neuronalen Zelltypen exprimiert sind, aber nur in bestimmten neuronalen Populationen zum Zelltod führen, läßt auf eine Beteiligung weiterer zelltypspezifischer Faktoren schließen. Die Glutaminsequenzamplifikation führt möglicherweise beim AR zu einer strukturellen Veränderung entweder des gesamten Proteins, oder aber des Teilbereiches, in dem sich die Glutaminsequenzamplifikation befindet. Die strukturelle Änderung könnte dann zu einer geänderten Interaktion mit anderen Proteinen führen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war einen oder mehrere solcher Faktoren zu identifizieren. In weiteren Versuchen sollte dann der gefundene Faktor im Zellsystem auf seinen Bezug zum Androgenrezeptor mit wildtyp und modifizierter Glutaminsequenz überprüft werden.

2 Material und Methoden

Material

2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro analysi (p.A.) Qualität bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser (über ein Milli-Q Reinstwasser-System [Millipore] gereinigt) in sterilen Gefäßen angesetzt und bei geeigneter Temperatur gelagert.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Aktivkohle	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bakterien-Petrischalen	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Casodex	Schering AG, Berlin
Coomassie Brillantblau R250	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Chloroform (p.A.)	Merck, Darmstadt
Chloroform (technisch)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Colchizin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Cyproteronacetat	Schering AG, Berlin
Dextran	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
<i>Easy Pure</i> DNA-Elution Kit	Biozym GmbH, Hess. Oldendorf
<i>ECL Westernblotting detection reagents</i>	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Merck, Darmstadt
Einschlußmedium	Shandon, Pittsburgh

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Ficoll	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Filterpapier 3MM	Bender & Hobein, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Gibco BRL Life Tech., Eggenst
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Fugene transfection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Gelatine	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glutamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
HEPES	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hydroxyflutamid	Schering AG, Berlin
Hyperfilm XR [®]	Amersham, Braunschweig
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Nürtingen
β-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Methanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsarcosyl	Geigy, Leverkusen
Natriumthiosulfat	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Nocodazol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Nonidet P-40	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Paclitaxel (Taxol)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
PMSF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyacrylamid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen GmbH, Hilden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNAse A	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Spermidin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sucrose	Roth GmbH + Co., Karlsruhe

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Tris-HCl, Tris-Base	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Triton X-100	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Trypsin	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Tween 20	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Xylencyanol	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

2.2 Allgemein verwendete Lösungen

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,3.

PBS (-Ca/-Mg): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,3.

TY-Medium: 1 % Trypton, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl.

2x TY-Medium: 2 % Trypton, 2 % Hefeextrakt, 1 % NaCl.

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0.

2.3 Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)- Amplifizierung der Glutaminhomopolymerfolge des menschlichen Androgenrezeptors

Q-Primer-1 zur Amplifizierung der Glutaminhomopolymerfolge des Androgenrezeptors in 3'-Richtung, mit 5'BamHI Schnittstelle:

5'ATGGATCCGTGATCCAGAACCCGGGCCCCAGG3'

Q-Primer-2 zur Amplifizierung der Glutaminhomopolymerfolge des Androgenrezeptors in 5'-Richtung mit 5'EcoRI Schnittstelle:

5'AGAATTCTCTGTTTCCTCATCCAGGACCAGGTAGC3'

2.4 Plasmidkonstrukte

Expressionsplasmide

pSGAR_{wt} (**ARQ22**, Culig *et al.*, 1993a) Menschliche cDNA des Wildtyp-Androgenrezeptors im Vektor pSG5 (Stratagene, LaJolla, CA, USA).

pSGAR_{GIR 20} (**ARQ45**) Androgenrezeptormutante mit einer auf 45 Glutaminreste verlängerten Glutaminhomopolymerfolge im Vektor pSG5 (Neuschmid-Kaspar *et al.*, 1995).

Die Konstrukte **ARQ77** und **ARQ1** wurden von Dr. Jean Schneikert zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch Klonierung der Glutaminsequenz aus den Konstrukten hARQ77 bzw. hARQ1 (Chamberlain *et al.*, 1994) in den pSGAR_{wt} Hintergrund hergestellt.

ARdNLSQ22 Androgenrezeptormutante mit einer Deletion der Aminosäuren 612 bis 633.

ARdNLSQ77 wurde erhalten durch NarI/Asp718 Verdau von **ARQ77** und anschließender Ligation in den mit NarI/Asp718 linearisierten ARdNLSQ22-Vektor.

ARdHBDQ22 Androgenrezeptormutante mit einer Deletion des C-Terminus ab Position 682.

ARdHBDQ77 wurde erhalten durch EcoRI/Asp718 Verdau von **ARQ77** und anschließender Ligation in den mit EcoRI/ Asp718 linearisierten ARdHBDQ22-Vektor.

Plasmide für die Konstruktion von GST-Fusionsproteinen

Für die Produktion von GST-Fusionsproteinen wurde der N-terminale Bereich des AR, der die Glutaminhomopolymerfolge enthält (AS 32-113) mit Hilfe der Oligonukleotide Q-Primer-1 und Q-Primer-2 in einer PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend in den mit BamHI und EcoRI linearisierten Vektor **pGex-2TK** inkloniert.

2.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Roche Diagnostics, Mannheim

Promega, Madison, WI, USA

United States Biochemicals, Cleveland
Ohio, USA

Modifizierende Enzyme

Proteinase K

Merck, Darmstadt

RNAse A

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

T4 DNA Ligase

Promega, Madison, WI, USA

Alkalische Phosphatase
aus Kälberdarm (CIP)

Roche Diagnostics

2.6 Antikörper

anti-hAR

F39.4.1 (BioGenex)

Monoklonaler (Maus-) Antikörper gegen AS 301-320 des menschlichen Androgenrezeptors.

AR44

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen Aminosäuren 201-222 des menschlichen Androgenrezeptors.

GST Antikörper (Sigma, Deisenhofen)

Monoklonaler Antikörper gegen Glutathion S-Transferase von *Schistosoma japonicum*.

1c2 Antikörper (erhalten von Jean-Louis Mandel, Illkirch Cedex, Frankreich)

Monoklonaler Antikörper gegen die Glutaminsequenz des TATA-bindenden Proteins.

Tubulin Antikörper (Chemicon International, Hofheim)

Monoklonaler Antikörper gegen beta-Tubulin (MAB 380).

COX Antikörper (Firma Molecular Probes)

Monoklonaler Antikörper gegen Cytochrom Oxygenase.

Sekundärantikörper für Westernblot-Analysen

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

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

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

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

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

Polyklonale IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Maus-Immunglobuline, Fluorescein (FITC) markiert (Dianova GmbH, Hamburg).

Polyklonale IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-Immunglobuline, Fluorescein (FITC) markiert (Dianova GmbH, Hamburg).

2.7 Zelllinien und Kulturbedingungen

Cos-7

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

PC3

Menschliche Prostatakarzinomzelllinie; PC-3 Zellen und alle durch stabile Transfektion erhaltenen PC-3 Zellklone wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS kultiviert.

2.8 Bakterien

Für die Amplifizierung von Plasmiden wurde der Stamm *E.coli* K12 **XL1 blue** verwendet. Die Kultur erfolgte in TY-Medium. Bei Bedarf wurde dieses Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt.

Für die Präparation kompetenter Zellen wurde PSI-Medium (2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,4 % MgSO₄; 10 mM KCl, pH 7,7) verwendet.

Zur bakteriellen Expression von Fusionsproteinen wurde der Stamm *E. coli* **BL21(DE3)pLYsS** verwendet (Beschreibung in Studier *et al.*, 1990). Die Kultur erfolgte in 2x TY-Medium.

Methoden

2.9 Behandlung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml Oligonukleotid.

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zur nukleinsäurehaltigen wässrigen Lösung wurde ein gleiches Volumen Phenol gegeben und gut geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch dreiminütiges Zentrifugieren. Die obere wässrige Phase wurde zur weiteren Verwendung abgenommen.

Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 4,8) auf eine Konzentration von 0,25-0,3 M eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol erfolgte die Fällung für mindestens 30 min bei -20°C oder für mindestens 10 min bei -80°C. Das Präzipitat wurde anschließend bei 10.000 g 20 min lang zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde mit 80 prozentigem Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und an der Luft oder im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®) getrocknet.

2.10 DNA-Präparation

Präparation großer Mengen Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Die Präparation wurde nach dem Prinzip der Ionenaustauscher-Säulenchromatographie zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels *Qiagen-tip-500 Säulen* (Qiagen) durchgeführt.

250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, TY-Kulturmedium, 100 µg/ml Ampicillin) wurden 10 min bei 5000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, RNase A 50-100 µg/ml, pH 8,0) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und etwa 5 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 (2,6 M Kac, pH 4,8) dazugegeben und für mindestens 10 min auf Eis belassen, danach wurde die Suspension bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter auf eine mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0, 15 % Triton X-100) äquilibrierte *Qiagen-tip-500* Säule gegeben. Nach Durchfluß des Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1M NaCl, 50mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 8,2) eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA aus der Lösung gefällt, das Präzipitat bei 13000 g abzentrifugiert und nach Waschen mit 70 prozentigem Ethanol getrocknet, in Wasser oder TE- Puffer aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation)

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, in TY-Kulturmedium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden 5 min bei 5000 g abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 200 µl 8 % Saccharose; 0,1 % Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10mg/ml) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 45 sec. Kochen im Wasserbad wurde 10 min bei 10.000 g zentrifugiert, um die Bakterentrümmer von der Plasmid-DNA-Lösung zu trennen. Die Bakterentrümmer wurden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 8 µl 5 % Cetyl-trimethylammoniumbromid (CTAB) in 0,5 M NaCl versetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach

Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g wurde die DNA in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst und mit 2,5 Volumina Ethanol präzipitiert. Nach Pelletieren, Waschen mit 80 prozentigem Ethanol und Trocknen wurde das DNA-Sediment in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA, pH 8,0 aufgenommen.

2.11 Klonierungstechniken

Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen

Für die Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden pro µg Plasmid-DNA 1U Enzym eingesetzt. Die Restriktion wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben, andernfalls wurde zuerst der Verdau bei niedrigerer Ionenstärke durchgeführt und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung das zweite Enzym mit entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke zupipettiert. Bei Plasmid-DNA aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0,5 µg/µl RNase A zugegeben. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:1 gemischt, mit 2 µl 10x Ligasepuffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM Spermidin, 1 mg/ml BSA und 10 mM ATP) und 1-3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Anschließend wurde mit H₂O das Volumen der Reaktion auf 20 µl ergänzt und für 16 h bei 15°C inkubiert.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8 - 1,5 prozentige Agarosegele in TBE-Puffer (90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure und 2,5 mM EDTA, 0,3 µg/ml

Ethidiumbromid) benutzt. Die Auftrennung erfolgte in einer (Horizontal-) Gelelektrophoresekammer bei 35 - 45 mA (50 - 100 V). Die DNA-Banden sind bei UV-Bestrahlung infolge der Ethidiumbromidfärbung sichtbar.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *EasyPure* DNA Elution Kits der Firma Biozym GmbH, Hess. Oldendorf nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

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

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

Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) mit dem T7-Sequense-Kit der Firma USB, Cleveland Ohio sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,2 mM EDTA und 0,2 M NaOH denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 2,5 ng bzw. 40 ng der entsprechenden Sequenzier-Primer gemischt, auf 65°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit α³⁵S-dATP erfolgte die eigentliche Kettenabbruch-Reaktion mit den vier Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA, pH 7,8; 95%

Formamid, 0,05 % Xylencyanol, 0,05 % Bromphenolblau) und 3 min Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gel aufgetragen.

2.12 Transformation von Bakterien

Präparation kompetenter *E.coli* Bakterien (Hanahan, 1986)

Eine Kolonie von *E.coli* XL1-Blue-Bakterien wurde in 10 ml SOC-Medium (0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 2 % Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 500 ml SOC-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und im 5l-Kolben bei 37°C so lange geschüttelt, bis die optische Dichte bei 550 nm einen Wert von 0,4 erreichte (ungefähr 2 h). Die Bakterienkultur wurde auf zwei 250-ml Plastikzentrifugenbecher verteilt und 15 min auf Eis gestellt. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 1.000 g (4°C) wurde der Überstand entfernt, die Bakteriensedimente in je 10 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 3 mM HAcOCl₃, 10 mM K-MES, pH 6,3; 15 % Glycerin) durch Schwenken resuspendiert und in zwei eisgekühlte 50 ml Greiner Plastik-Röhrchen überführt. Nach Auffüllen auf 50 ml mit STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM HAcOCl₃, 10 mM K-Mes pH 6,3, 15 % Glycerin), Mischen und 10minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakterienlösung 15 min bei 1.000 g (4°C) zentrifugiert. Die beiden Niederschläge wurden in je 10 ml TFB durch Schwenken resuspendiert und in einem 50 ml Greiner-Plastik-Röhrchen (eisgekühlt) vereinigt. Die nun kompetenten Bakterien wurden portionsweise bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz der so präparierten Bakterien liegt bei etwa 1 - 5x 10⁶ Kolonien pro µg pBR322-DNA.

Transformation kompetenter Bakterien

Hierzu wurde ein auf -80°C aufbewahrtes Aliquot kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl des Ligationsansatzes zugemischt und 1 h auf Eis gestellt. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis wurde 3 ml SOC-Medium zugegeben und 90

min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 5 min bei 1.000 g abzentrifugiert (RT) und in 200 µl SOC-Medium gelöst. Die gesamte Menge wurde auf einer Selektiv-Agar-Platte ausgestrichen.

Einfrieren von Bakterien

Einer Bakterienkultur, welche 12 h bei 37°C unter Schütteln gewachsen war, wurden 900 µl entnommen, mit 100 µl DMSO vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

Herstellung von Selektiv-Agarplatten

In einem 2l-Kolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar mit H₂O_{bide} auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Der Agar wurde in Bakterienkulturschalen gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

2.13 Zellkultur

Ablösen von Zellen

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 2 ml 0,25 % Trypsin gespült und anschließend mit 0,25 % Trypsin (2,5 ml pro 9 cm-Kulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 7,5 ml Kulturmedium aufgenommen. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurden diese aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert (3 min, 300-400 g) und in neuem Kulturmedium aufgenommen.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrysiniert, abzentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (Medium, 10 % FCS, 1 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Tag bei -80°C in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C . Danach wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen verteilt.

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

Diese Methode dient der Reinigung von fötalem Rinderserum (*fetal calf serum*, FCS) über Aktivkohle von darin enthaltenen fettlöslichen Bestandteilen (also auch von Steroidhormonen). Es wurden 50 ml dextrangebundene Aktivkohle (25 g Aktivkohle, 2,5 g Dextran, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 pro Liter H_2O) für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu diesem Aktivkohlepellet wurde dann 250 ml FCS gegeben, resuspendiert und die Lösung 30 min bei 56°C im Wasserbad geschüttelt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g wurde diese Behandlung mit dem Überstand der Zentrifugation nochmals wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g wurde das nun von fettlöslichen Bestandteilen gereinigte Serum sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.14 Transiente Transfektion

Elektroporation (nach Eul *et al.*, 1989)

Cos-7 Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Es wurden jeweils 10 μg zu transfizierende DNA eingesetzt. Am Tag vor der Transfektion wurden je Transfektionsansatz 2×10^6 Zellen ausgesät. Diese wurden am darauf folgenden Tag in je 0,8 ml PBS (-Ca/-Mg)

aufgenommen und zusammen mit der zu transfizierenden Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporationsgerät der Firma Biorad bei 0,2V/500 µF. Nach dem Stromstoß wurde der Inhalt der Küvette sofort in eine 9 cm-Petrischale mit vorgelegtem Medium überführt.

FuGene Transfektion (Roche Diagnostics, Mannheim)

Die Transfektion mit der FuGene Substanz wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Pro 3,5 cm Kulturschale wurden dabei 5 µl FuGene und 1,5 µg Gesamt-Plasmid-DNA eingesetzt.

2.15 Immunfluoreszenznachweis des Androgenrezeptors

Kultivierung und Behandlung von Zellen für die immuncytochemische Färbung

Je ein Deckgläschen (18x 18mm) wurde in eine 3,5 cm Kulturschale gelegt. 5×10^4 Cos-7 Zellen pro Schale wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät. 24 h nach der Transfektion mit FuGene Transfektionsreagenz wurden die Zellen in Kulturmedium mit 3 % CCS für weitere 24 h kultiviert und anschließend wie in den einzelnen Versuchsbeschreibungen angegeben mit Induktoren bzw. Nocodazol behandelt.

Fixierung und immuncytochemische Färbung von Zellen

Nach erfolgter Behandlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (3 ml pro 3,5 cm Kulturschale) gewaschen. Das PBS wurde vollständig abgesaugt und sofort 3 ml -20°C kaltes Methanol auf die Zellen gegeben. Die Kulturplatten wurden dann für mindestens 15 min bei -20°C inkubiert. Danach wurde das Methanol dekantiert und die Zellen 3 mal mit je 3 ml PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden entweder sofort immuncytochemisch gefärbt oder über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die immuncytochemische Färbung erfolgte in den

gleichen Kulturschalen, in denen zuvor die Zellen kultiviert und fixiert worden waren. Die Zellen wurden zunächst zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 30 min in 1 ml Blockierungspuffer (PBS, 0,2 % (w/v) Gelatine, 0,1 % (v/v) Triton X-100) vorinkubiert. Nach dem Absaugen des Blockierungspuffers wurden die Deckgläschen mit je 100 µl der Primärantikörperlösung (Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungspuffer) für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Deckgläschen mit je 3 ml PBS fünf mal für je 3 min gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl der Sekundärantikörperlösung (in entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer). Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit je 3 ml PBS 5 mal für 3 min gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann mit Einschlußmedium (Shandon) auf Objektträger montiert und bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.16 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen

Proteinbestimmung (nach Lowry *et al.*, 1951)

Die Bestimmung der Proteinmenge in Zell- und Gewebeextrakten erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951). Für das Erstellen einer Eichkurve wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl einer BSA Stammlösung (1mg/ml) mit Lowry-Reagenz I (2 % (w/v) Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) auf 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden je 5 µl mit 495 µl Lowry-Reagenz I gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz IV (100 Volumen Lowry-Reagenz I, 1 Volumen 2 % (w/v) Na-K-Tartrat, 1 Volumen 1 % (w/v) CuSO₄) wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden unter sofortigem Mischen 100 µl 50 % Folin-Lösung zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurden jeweils 300 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 600 nm in einem Photometer (Multiscan Plus MKII, Labsystems, Finnland) gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Anhand der Eichkurve wurde dann die Proteinmenge in den Proben bestimmt.

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

Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 5 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen rundherum mit Agarose abgedichtet. Für die 10 % Trenngellösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS und 10 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS und 0,05 % TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen. Bis zum Auspolymerisieren des Trenngels wurde es mit Ethanol überschichtet. Für die 5 % Sammelgellösung wurden 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1 % (w/v) APS und 0,1 % TEMED versetzt. Das Sammelgel wurde (nach Entfernen des Ethanols) auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Laemmli-Probenpuffer (80 mM Tris pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % Glycerin, 2 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit vorgefärbten Proteinen mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und dann bei 30 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Nach der Gelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (siehe *Westernblot*). Coomassie-Brillantblau angefärbte Gele wurden auf Whatmann 3MM Papier aufgezogen und auf einem Gel Trockner (Bio Rad Laboratories GmbH, München) getrocknet.

Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (Westernblot)

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransfer-Kammer (Trans-Blot, Bio Rad Laboratories GmbH, München) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran auf das Gel gelegt und luftblasenfrei zwischen je drei Lagen Whatman 3MM-Papier (mit Transfer-Puffer befeuchtet) in eine Trägerplatte montiert. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) gefüllte Kammer eingesetzt, so daß die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 300 mA. Nach beendetem Transfer wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2-16 h bei Raumtemperatur in PBS mit 10 % (w/v) Magermilchpulver, 0,15 % Tween 20 geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (im geeigneten Verdünnungsverhältnis in PBS mit 10 % (w/v) Magermilchpulver, 0,15 % Tween 20) luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann fünf mal für 5 min in PBS 0,2 % Tween 20 gewaschen und danach, analog zur ersten Hybridisierung, mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:3000 verdünnt in PBS mit 10 % (w/v) Magermilchpulver, 0,2 % Tween 20) für eine Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS mit 0,2 % Tween 20 wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die Detektion mittels Chemolumineszenz basiert auf der Oxidation eines Substrates, bei der Licht freigesetzt wird - katalysiert von der Meerrettich-Peroxidase unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Hierzu wurde die Membran mit 3 ml einer frischbereiteten 1 : 1-Mischung der ECL *Westernblot* Nachweisreagenzien (Amersham, RPN 2106) beschichtet und in Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde dann so lange ein Röntgenfilm exponiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

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

Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Das Gel wurde zunächst unter ständigem Schütteln 2 h in 40 % Methanol, 12 % Eisessig fixiert. Danach wurde zwei mal 20 min in einer 30 prozentigen Ethanolösung gewaschen. Anschließend wurde das Gel für eine min in eine frisch angesetzte 0,02 % Na-Thiosulfatlösung gegeben. Nach zwei mal 30 sek Waschen erfolgte die Färbung für 20 min in 0,2 % AgNO_3 , 0,03 % Formaldehyd. Danach wurde das Gel zwei mal eine min gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 6 % Na_2CO_3 , 0,02 % Formaldehyd, 0,02 % Na-Thiosulfat solange, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Anschließend wurde das Gel zwei mal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen.

2.17 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen

Produktion und Reinigung von GST Fusionsproteinen (nach Smith und Johnson, 1988)

Für die Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellem Rohlysate nutzt man die hohe Affinität von GST zu Glutathion, welches an Agarose oder Sepharose immobilisiert wurde. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins ist hierzu in einem speziellen Vektor an das 3'-Ende des GST-Gens kloniert. Zur Expression der Plasmide wurde der *E.coli* Stamm BL21 Lys S verwendet, der mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert wurde. 50 ml einer stationären

Kultur dieses Bakterienstammes wurde mit 2x TY–Selektionsmedium (2 % Hefeextrakt, 4 % (w/v) Bacto-Trypton, 2 % (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) auf 400 ml verdünnt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Expression des Fusionsproteins in den Bakterien durch Zugabe von 0,2 M IPTG induziert und die Bakterien weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 g und 4°C sedimentiert und in 10 ml PBS (-Ca/-Mg) mit 2 mM EDTA und 2mM PMSF resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch Sonifizieren (Branson Sonifier, G. Heinemann) wurden die Zellen aufgebrochen und die bakterielle DNA geschert. Nach Zugabe von 1 % Triton X-100 wurden unlösliche Bakterienbestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und 4°C entfernt. Die Fusionsproteine im Überstand wurden zur Kopplung an Glutathion mit 4 ml in PBS gequollener Glutathion-Agarose (1:1 in PBS (-Ca/-Mg) für 1 h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml eiskaltem PBS (-Ca/-Mg) wurde die Glutathion-Agarose mit den gebundenen Fusionsproteinen auf eine Säule transferiert. Das Fusionsprotein wurde mit 9 ml 5 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris pH 8,0) in 1 ml Fraktionen bei 4°C aus der Säule eluiert. Das Vorkommen des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein wurden vereinigt und gegen PBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Nach der Dialyse wurde eine Konzentrationsbestimmung nach Lowry durchgeführt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde entweder mit 10 % Glycerin und 1 mM DTT versetzt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren, oder für maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

Präparation von Proteinextrakten aus Mausgehirnen

Die Gehirne von 10 Mäusen wurden frisch präpariert und in 10 ml 20 mM HEPES pH 7,2, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20 durch 20-30 Stöße in einem Dounce Homogenisator (S) auf Eis homogenisiert. Das Lysat wurde 1h bei 150.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde frisch zur Durchführung einer Glutamin-Sequenz-Bindestudie weiterverwendet.

Affinitätschromatographie

Gleiche Mengen der unterschiedlichen GST-Fusionsproteine (800 µg) wurden durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur an je 400 µl in PBS (im Verhältnis 1:1 (v/v)) gequollener Glutathion-Agarose gekoppelt. Nach der Inkubation wurde die Trägermatrix mit den daran gekoppelten Fusionsproteinen in eine Poly-Prep®-Säule (BioRad, München) überführt und durch dreimaliges Spülen mit je einem ml Mausgehirnlysispuffer (20 mM HEPES pH 7,2, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20) äquilibriert. Nach der Äquilibrierung wurde die Säule verschlossen und die an die Glutathion-Agarose gebundenen Fusionsproteine mit je 3 ml Mausgehirnextrakt 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Mausgehirnextrakt aus den Säulen drainiert und die Säulen fünf mal mit jeweils zwei ml Mausgehirnlysispuffer gewaschen. Anschließend wurde fünf mal mit 300 µl Mausgehirnlysispuffer (mit zusätzlich 1 M KCl) eluiert. Die Fraktionen wurden getrennt gesammelt und sofort mit 2 x Laemmlis Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden entweder sofort in einem Proteingel aufgetrennt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.18 Kosedimentationsexperiment (nach Vallee, 1982)

Eine grafische Darstellung des Experimentes ist in Abb. 3 gezeigt. Die einzelnen Schritte sind nummeriert. Die an den einzelnen Stellen entnommenen Aliquots sind rot gekennzeichnet. Unterschiedliche AR-Konstrukte wurden in Cos-7 Zellen transient transfiziert. Je Konstrukt wurden insgesamt 6×10^6 Zellen in drei verschiedenen Ansätzen elektroporiert 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Eis in insgesamt 800 µl Mikrotubulistabilisierungspuffer (0,1 M PIPES, pH 6,6, 1 mM EGTA, 1,0 mM MgSO₄) geerntet (Abb. 1,(1)). Die Zellsuspension wurde mit einer G23 Kanüle durch 15maliges Aufziehen der Spritze homogenisiert (2). Das Homogenisat wurde bei 15.000 g zentrifugiert (3). Der Überstand wurde danach ein weiteres Mal für 45 min mit 400.000 g bei 4°C zentrifugiert (4). Anschließend wurde Taxol zu einer Endkonzentration von 40µM und GTP zu einer

Endkonzentration von 1mM zugegeben (5). 600 µl des Zellhomogenisates wurden für 30 min bei 37°C inkubiert (6) und anschließend mit 250.000 g bei 37°C durch 600 µl eines Sucrose-Kissens (Mikrotubulistabilisierungspuffer, 5 % Sucrose, 40 µM Taxol, 1 mM GTP) in einem *swing out rotor* zentrifugiert (7). Anschließend wurde der Überstand bis zur Oberfläche des Kissens abgesaugt. Das Kissen wurde vorsichtig mit 1 ml H₂O_{bidest} überschichtet. Danach wurde der gesamte Überstand abgesaugt (in der Grafik nicht dargestellt). Das Pellet wurde in 200 µl Mikrotubulistabilisierungspuffer gewaschen (8) und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die einzelnen Aliquots wurden durch SDS Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

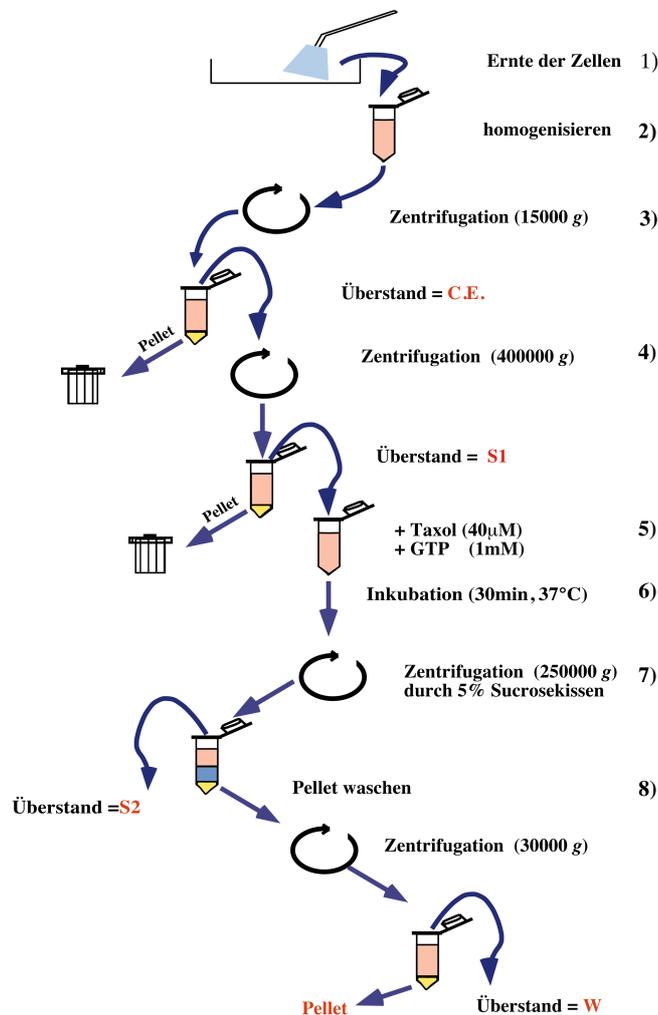


Abb. 3 Schematische Darstellung des Kosedimentationsexperimentes. Erläuterung im Text.

3 Ergebnisse

3.1 Der 1c2 Antikörper erkennt den Androgenrezeptor in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge

Ein Indiz für die Änderung der Proteinstruktur durch die Verlängerung der Glutaminsequenz im AR stellt das Bindungsverhalten eines monoklonalen Antikörpers dar, der gegen die Glutaminsequenz des TATA bindenden Proteins (TBP) erzeugt wurde. Von diesem 1c2 Antikörper ist bekannt, daß er Glutaminsequenzen in Abhängigkeit von ihrer Länge erkennt (Trottier *et al.* 1995). Es zeigte sich dabei, daß die Bindungsaktivität des Antikörpers im *Westernblot*, mit der Länge der betreffenden Sequenz im Huntingtin, Ataxin-1 und Ataxin-3 unverhältnismäßig stark anstieg. Aus diesem Grund wurde der 1c2 Antikörper ebenfalls in einem *Westernblot* Experiment auf seine Affinität zum Androgenrezeptor (AR) getestet (Abb.4). Cos-7 Zellen wurden mit unterschiedlichen Androgenrezeptorkonstrukten transfiziert. Es handelte sich dabei um Rezeptoren mit unterschiedlich langer Glutaminhomopolymerfolge. Die Länge der Glutaminsequenz variierte zwischen einem Glutaminrest im Konstrukt ARQ1, 22 Glutaminresten im Konstrukt ARQ22, 45 Glutaminresten im Konstrukt ARQ45 und 77 Glutaminresten im Konstrukt ARQ77. Als Kontrolle für die unspezifische Antikörperbindung wurden die Zellen ebenso mit dem pSG5 Leervektor transfiziert. Um zu überprüfen, ob weitere, durch Hormonbindung bewirkte konformationelle Änderungen des Rezeptors, einen Einfluß auf die Erkennung durch den Antikörper hatten, wurden die transient transfizierten Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT) behandelt. Die aus diesen Zellen erhaltenen Extrakte wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt. Die Inkubation mit dem anti-AR 44 Antikörper, der gegen einen weiter carboxy-(C)-terminalen Bereich außerhalb der Glutaminsequenz gerichtet ist, ergab eine ungefähr gleich starke Expression der unterschiedlichen AR-Varianten (Abb. 4 B Spuren 3 - 10).

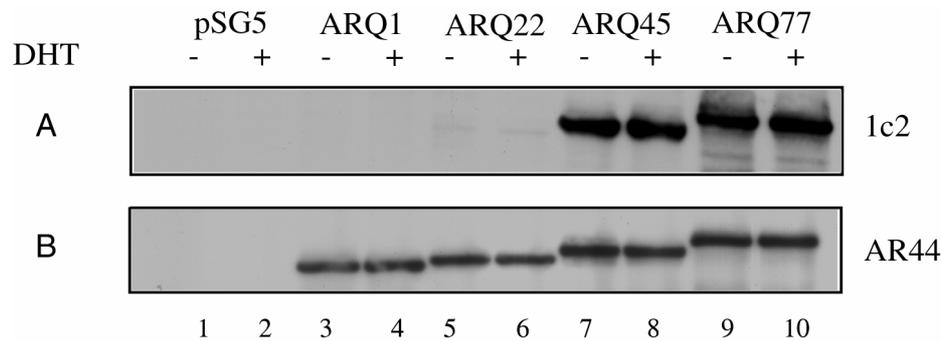


Abb. 4. Der AR wird in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge vom 1c2 Antikörper erkannt. *Westernblot*-Analyse mit Extrakten aus transient transfizierten Cos-7 Zellen. Je 5×10^4 Zellen wurden mit 1,5 μg leerem Expressionsvektor (pSG5), ARQ1-, ARQ22-, ARQ45-, und ARQ77-Konstrukten mit FuGENETM Transfektionsreagenz transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 3 % CCS für weitere 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen für 3 h mit DHT (100 nM) oder als Kontrolle mit 0,08 % (v/v) des Lösungsmittels (Ethanol) behandelt. Nach der Ernte der Zellen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben im SDS-Gel. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran überführt und anschließend zunächst (A) mit dem polyklonalen anti-AR Antikörper AR44 Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Meerrettich Peroxidase-(HRP)-gekoppelten sekundären anti-Kaninchen Antikörpers wurden die gebundenen Antikörper mit dem *enhanced chemiluminiszens* (ECL)-System detektiert. Danach wurden die Antikörper von der Membran entfernt. Es folgte (B) die Inkubation mit dem 1c2 monoklonalen Antikörper und die darauf folgende Inkubation mit dem HRP gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper mit erneuter ECL. Die benutzten Antikörper sind am rechten Rand angegeben. Die Konstrukte und die Art der Behandlung sind am oberen Rand angegeben.

Die anschließende Inkubation der selben Membran mit dem 1c2 Antikörper zeigte, daß der Antikörper den Rezeptor in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminsequenz erkannte. Dabei lag die Affinität des Antikörpers zum ARQ77 leicht höher als zum ARQ45 (vergleiche Abb. 4 A Spuren 7 und 8 mit 9 und 10). Der ARQ22, der mit 22 Glutaminresten eine Sequenz mit nicht pathogener Länge enthielt, war mit diesem Antikörper nur sehr schwach detektierbar (Abb. 4 A Spur 5 und 6). Der 1c2 Antikörper zeigte keinerlei Bindungsaktivität zu dem Rezeptor mit nur einem Glutamin an der Stelle der Homopolymerfolge (ARQ1, Abb. 4 Spuren 3 und 4). Es zeigte sich auch, daß die Behandlung der Zellen mit DHT keine geänderte Interaktion des Antikörpers mit dem Rezeptor zur Folge

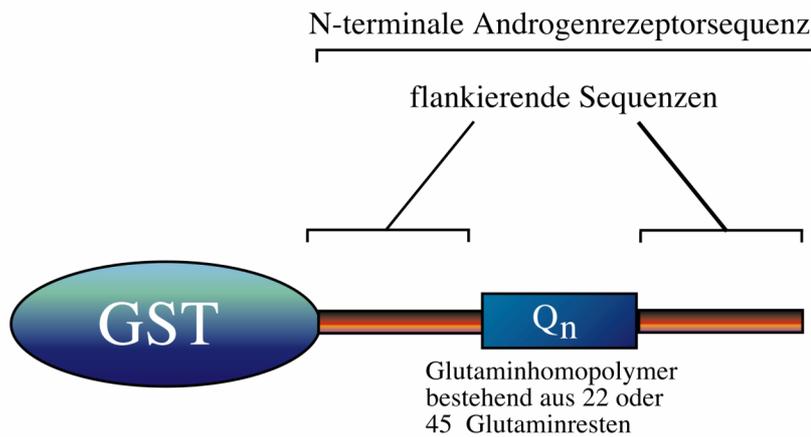
hatte (vergleiche Abb. 4 A jeweils die Spuren in denen mit DHT behandelte und unbehandelte Extrakte aufgetragen wurden). Der 1c2 Antikörper erkennt also auch den AR in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge. Die Zunahme der Affinität ist dabei nicht linear, da sich bei einer Verdoppelung der Glutaminsequenzlänge (von 22 auf 45) ein um das Vielfache stärkeres Signal detektieren ließ (Abb. 4 A vergleiche Spur 5 und 6 mit 7 und 8). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem für andere glutaminsequenzamplifizierte Proteine wie z.B. Huntingtin (Trottier *et al.* 1995) beschriebenen Bindeverhalten des 1c2 Antikörpers. Aus diesem Grund kann man für den AR mit der verlängerten Glutaminsequenz auf eine ähnliche Strukturänderung schließen, wie sie auch bei den anderen glutaminsequenzamplifizierten Proteinen zu beobachten war. Für eine gezielte Suche nach zellulären Proteinen, die spezifisch entweder an die verlängerte oder die kurze Glutaminsequenz des AR binden, wurde ein biochemischer Ansatz gewählt. Auf diese Art wurden direkt Proteine angereichert, die in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge interagierten.

3.2 Ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa bindet ausschließlich an die 22mer Glutaminsequenz des AR

Für die direkte Suche nach Proteinen, die mit der Polyglutaminsequenz in Abhängigkeit von ihrer Länge interagierten wurden zunächst zwei chimäre cDNA Konstrukte bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST) und der Glutaminsequenz des AR kloniert (Abb. 5 A). Dabei repräsentierte ein Konstrukt mit 22 Glutaminresten den Wildtyp und ein weiteres mit 45 Glutaminresten die aus einem Patienten isolierte pathogene Sequenzlänge (Abb. 5 A). Um zunächst zu überprüfen, ob die so klonierten Sonden, wie die Ausgangsproteine (ARQ22 bzw. ARQ45), einen von dem 1c2 Antikörper erkannten strukturellen Unterschied aufwiesen, wurden sie im *Westernblot*-Verfahren mit dem 1c2 Antikörper inkubiert. Abb. 5 B zeigt, daß auch die isolierten, an GST fusionierten Glutaminsequenzen des AR unterschiedlich erkannt wurden. Der 1c2 Antikörper wies eine wesentlich höhere Affinität zu der verlängerten Glutaminsequenz auf. Daß dies nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen war

wurde durch eine mit dem GST-Antikörper durchgeführte Quantifizierung der aufgetrennten Proteinmengen gezeigt (Abb. 5 B). Im Vergleich zu GST und GST-Q22 wurde sogar weniger der GST-Q45 Sonde in dem Proteingel aufgetrennt.

A



B

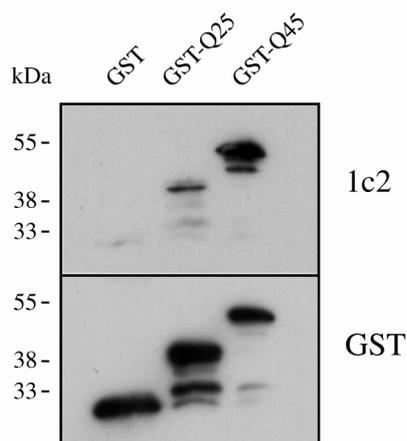
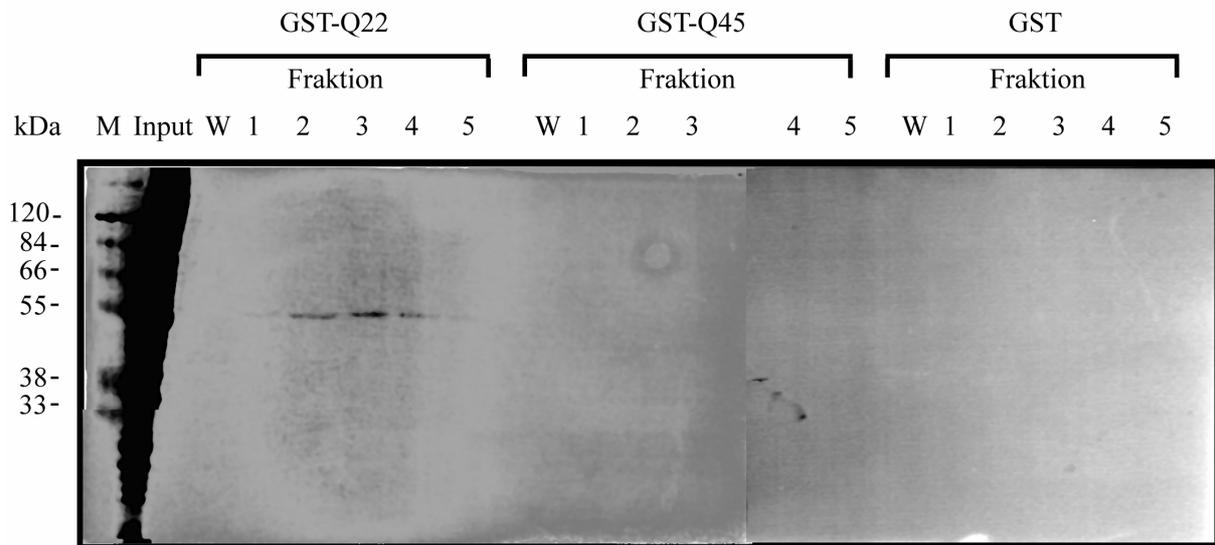


Abb. 5 Glutathion-S-Transferase- (GST)-Sonden. (A) Schematische Darstellung der GST-Sonden. Die N-terminale Sequenz des AR mit der Glutaminhomopolymerfolge flankiert von 30 Aminosäuren auf beiden Seiten der Sequenz wurde hinter das Glutathion-S-Transferase-(GST)-Gen kloniert. Es wurden zwei identische

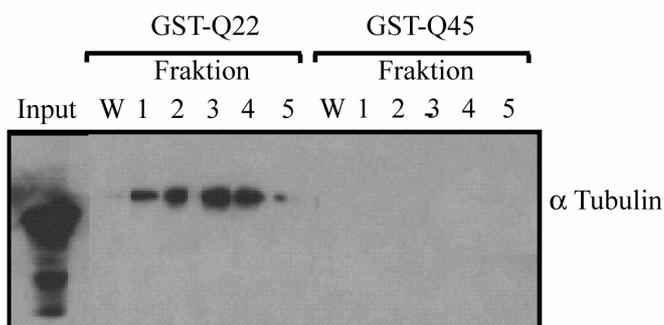
Sonden kloniert, die sich nur in der Länge der Glutaminsequenz unterschieden (22 bzw. 45 Glutaminreste). **(B)** Der 1c2 Antikörper erkennt die GST-Sonden in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge GST alleine. Die GST-Q22- und die GST-Q45-Sonde wurden in Bakterien exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Proteinmenge wurde durch einen Standardvergleich im Coomassie gefärbten Gel bestimmt. Gleiche Mengen der unterschiedlichen Proteine wurden anschließend im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem Antikörper gegen die Glutathion-S-Transferase inkubiert. Nach der Detektion der Proteine mittels ECL wurden die Antikörper von der Membran entfernt, und es erfolgte eine weitere Inkubation mit dem 1c2 Antikörper mit anschließender ECL. Die Proteingrößen sind am linken Rand angegeben und die jeweils eingesetzten Antikörper am rechten Rand. Die aufgetragenen Proteine sind am oberen Rand angegeben.

Um Proteine anzureichern, die mit der Glutaminsequenzregion des AR interagieren, wurden gleiche Mengen der an GST fusionierten Glutaminsequenzen (GST-Q22, GST-Q45) an eine Glutathion-Matrix gekoppelt und mit einem frisch präparierten Extrakt aus Mäusehirnen inkubiert. Die Verwendung von Mäusehirnen als Ausgangsmaterial sollte die Anreicherung von neuronenspezifischen Faktoren ermöglichen. Die gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Coomassiefärbung der rekombinanten Protein-Sonden diente als Mengenkontrolle (Abb. 6 C). Nach der Inkubation der Sonden und darauf folgendem mehrmaligem Waschen wurde das spezifisch gebundene Material unter Hochsalzbedingungen eluiert. Die Eluate wurden anschließend im SDS-Proteingel aufgetrennt. Die anschließende Silberfärbung des Gels ergab, daß ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa sich ausschließlich von der GST-Q22 Sonde, nicht aber von der Sonde mit verlängerter Glutaminsequenz (GST-Q45) eluieren ließ (Abb. 6 A vergleiche jeweils die von der GST-Q22 eluierten Fraktionen 1-5 mit den entsprechenden von GST-Q45 eluierten Fraktionen). Dieses Protein interagierte ebensowenig mit GST alleine (Abb. 6 A vergleiche die von GST-Q22 eluierten Fraktionen 1 - 5 mit den entsprechenden von GST eluierten Fraktionen). Aus dem in Abb. 6 A gezeigten, silbergefärbten Gel wurde die Bande mit der größten Intensität aus der mit Fraktion 3 bezeichneten Spur ausgeschnitten und zur Sequenzierung mittels *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI, Mann und Wilm, 1995) an das Labor von Matthias Mann (EMBL, Heidelberg) gesandt.

A



B



C

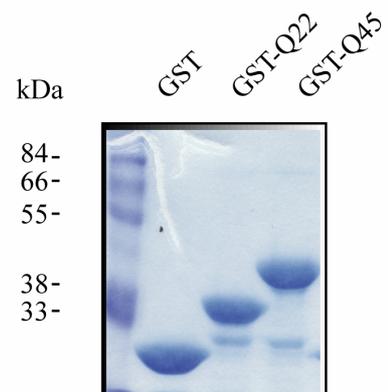


Abb. 6 Tubulin bindet spezifisch an die GST-Q22 Sonde. (A) Affinitätschromatographie Studie mit aus Mäusehirnen präparierten Extrakten. Je 800 μ g bakteriell exprimiertes GST, bzw. GST-Q22, GST-Q45 wurden an 400 μ l (1:1 (v/v) in PBS) Glutathion-Agarose gekoppelt und mit frisch aus Mäusehirnen präpariertem Extrakt inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10 % SDS-Gel

aufgetrennt. In den von 1-5 bezeichneten Spuren wurden je 20 Volumenprozent der erhaltenen Fraktionen aufgetrennt. In der mit "M" bezeichneten Spur wurde ein Molekulargewicht-Standard aufgetragen. In der mit „Input,“ bezeichneten Spur wurden 10 µg Gesamtprotein des aus Mäusegehirnen erhaltenen Extraktes aufgetragen. In der mit "W" bezeichneten Spur wurde 20 Volumenprozent des jeweils letzten Waschschruttes aufgetragen. (B) Immunoblot der aus A erhaltenen, in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennten, Fraktionen. In den von 1-5 bezeichneten Spuren wurden jeweils 5 Volumenprozent der von GST-Q22 bzw. GST-Q45 eluierten Fraktionen aufgetragen. In der mit "W" bezeichneten Spur wurden 5 Volumenprozent des jeweils letzten Waschschruttes aufgetragen. In der mit "Input" bezeichneten Spur wurden 5µg Gesamtprotein des aus Mäusegehirnen gewonnenen Extraktes aufgetragen. Die Proteine wurden an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt. Die Membran wurde anschließend mit dem anti-β-Tubulin Antikörper inkubiert, danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP markierten anti-Maus Sekundärantikörper. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL Systems. Die Größe des Standardmolekulargewichtes ist am linken Rand jeweils in kDa angegeben. (C) Als Ladekontrolle für das Affinitätschromatographie-Experiment wurde ein Aliquot der bakteriell exprimierten GST-Sonden und GST alleine vor der Kopplung an die Glutathion-Trägermatrix gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend Coomassie gefärbt. Ein Größenstandard wurde ebenfalls geladen. Die Proteingrößen sind am linken Rand angegeben.

3.3 Bei dem 50 kDa Protein handelt es sich um α- bzw. β-Tubulin

Die Sequenzierung des Proteins ergab, daß es sich um alpha bzw. beta Tubulin handelte. Um das Ergebnis der Sequenzierung zu verifizieren, wurde ein Teil der, in der Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt und im *Westernblot* mit einem monoklonalen Antikörper gegen β-Tubulin hybridisiert. Abb. 6 B zeigt, daß nur in den von der GST-Q22 eluierten Fraktionen eine Bindung des Antikörpers an Tubulin zu beobachten war. Dies bestätigt, daß Tubulin spezifisch mit der kurzen Glutaminsequenz (Q22), nicht aber mit der langen Glutaminsequenz (Q45) interagiert. Um diesen Befund in unabhängigen Versuchsansätzen zu bestätigen wurden Kosedimentationsexperimente durchgeführt.

3.4 Interaktion des Androgenrezeptors mit Mikrotubuli

Mikrotubuli sind die durch Tubulin aufgebaute Strukturen, die einen Teil des Cytoskelettes darstellen. Um zu überprüfen, ob die für die GST-Sonden gefundenen Affinitätsunterschiede für den gesamten AR von Bedeutung sind, wurde zunächst eine *in vitro* Interaktionsstudie zwischen Mikrotubuli und dem AR durchgeführt. Das Prinzip dieses Experimentes besteht in der Kosedimentation von durch Taxol stabilisierten Mikrotubuli und daran gebundener Faktoren mittels Ultrazentrifugation aus Zellysaten (nach Vallee, 1982). Nach der Ernte und Lyse der mit dem ARQ22 transfizierten COS-7 Zellen erfolgte die Polymerisierung und Stabilisierung von Mikrotubuli mittels Taxol und GTP-Gabe. In einer daran anschließenden Zentrifugation wurden die Mikrotubuli und assoziierte Faktoren sedimentiert. Abb. 7 B zeigt das Coomassie gefärbte Gel der gelektrophoretischen Auftrennung der bei diesem Experiment erhaltenen Fraktionen. In der mit "C.E" bezeichneten Spur (1) wurde ein Aliquot des eingesetzten gesamten Zellysates aufgetragen. Um sedimentierbare Bestandteile zu entfernen, wurde zunächst in einem Reinigungsschritt das Lysat ultrazentrifugiert. Dies hatte keinen Einfluß auf die Konzentration der im Coomassie gefärbten Gel erkennbaren Proteine (Abb. 7 B vergleiche Spuren 1 und 2). Nach der Stabilisierung der Mikrotubuli in dem Extrakt wurde nochmals zentrifugiert anschließend wurde das Pellet gewaschen. Die Tubulin repräsentierende Bande (Abb. 7 B Pfeil) war nach dem Zentrifugationsschritt nicht mehr im Überstand zu erkennen (Abb. 7 B Spur 3). Der nach dem Waschen des Pellets erhaltene Überstand enthielt keine im Coomassie gefärbten Gel sichtbare Proteine (Abb. 7 B Spur 4). Die gelektrophoretische Auftrennung der Pelletfraktion ergab, daß Tubulin ausschließlich in dieser Fraktion angereichert war (Abb. 7 B Spur 5). Gleiche Mengen der jeweiligen Proteinfractionen wurden nochmals gelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt und im *Westernblot*-Verfahren analysiert. Durch Inkubation der auf Nitrozellulose übertragenen Proteine mit dem polyklonalen anti-AR Antikörper wurde das Vorkommen des AR in den jeweiligen Fraktionen überprüft (Abb. 7 A). Auch der AR war nach dem Reinigungsschritt in unveränderter Konzentration im Überstand enthalten (Abb. 7 A vergleiche Spuren 1 und 2). In Analogie

zum Sedimentationsverhalten der Mikrotubuli war der AR nicht mehr im Überstand S2 nachweisbar (Abb. 7 A Spur 3), sondern akkumulierte vollständig in der Pelletfraktion (Abb. 7 A Spur 5).

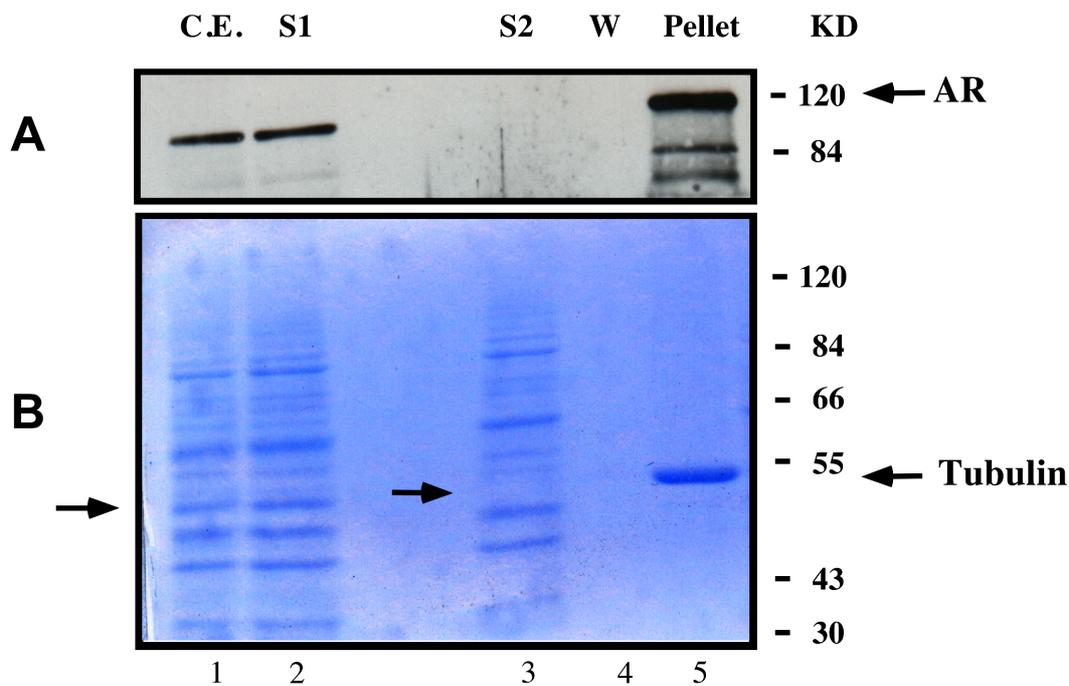


Abb. 7 Der Androgenrezeptor interagiert *in vitro* mit Mikrotubuli. Kosedimentationsexperiment des AR mit Mikrotubuli aus Taxol behandelten Cos-7 Zellextrakten. In einem dreifachen Ansatz wurden jeweils 2×10^6 Cos-7 Zellen durch Elektroporation mit jeweils 15 μg des ARQ22-Expressionsvektors transfiziert und anschließend in Dulbecco's modifiziertem *Eagle* Medium (DMEM) 10 % FCS kultiviert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen auf Eis in Mikrotubulistabilisierungspuffer geerntet. Die Zellsuspension wurde homogenisiert. Das Homogenisat wurde einem ersten Zentrifugationsschritt unterzogen. Durch einen weiteren Ultrazentrifugationsschritt wurden sedimentierbare Bestandteile aus dem Extrakt entfernt. Anschließend wurde Taxol zu einer Endkonzentration von 40 μM und GTP zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Das Zellhomogenisat wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch ein Sucrosekissen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde gewaschen, nochmals durch Zentrifugation sedimentiert und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Im Verlauf des Experimentes wurden von den erhaltenen Extrakten und Fraktionen Aliquots entnommen. Die Aliquots wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Sie sind wie folgt bezeichnet: CE: Extrakt nach dem ersten Zentrifugationsschritt; S1 Extrakt nach dem zweiten Zentrifugationsschritt; S2 Überstand nach Zentrifugation durch das Sucrosekissen; W: Überstand des

Waschschrilles nach erneuter Sedimentation des Pellets; Pellet: Pelletfraktion nach Waschschrill. (A) Der Androgenrezeptor kosedimentiert mit *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt. Der AR wurde mit dem polyklonalen anti-AR 44 Antikörper im *Westernblot*-Experiment nachgewiesen. (B) Mikrotubuli sind nach der Zentrifugation vollständig in der Pelletfraktion angereichert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Fraktionen wurde das Gel Coomassieblau gefärbt und fotografiert.

3.5 Der Einfluß der Glutaminsequenzlänge auf die Kosedimentation des Androgenrezeptors mit Mikrotubuli

Um zu überprüfen, welchen Einfluß die Verlängerung der Glutaminhomopolymerfolge auf die Interaktion des AR mit Mikrotubuli hatte, wurde das Kosedimentationsverhalten des ARQ77 im Vergleich zu ARQ22 überprüft. Extrakte aus mit ARQ22 bzw. ARQ77 transfizierten COS-7 Zellen wurden in dem oben beschriebenen Verfahren unterzogen. Die relativen Mengen an ARQ22 bzw. ARQ77 und Tubulin wurden im semiquantitativen *Westernblot* bestimmt. Für dieses Experiment fand ein Androgenrezeptor mit einer relativ langen Homopolymerfolge von 77 Glutaminresten Verwendung. Vergleichbare Tubulinkonzentrationen waren in den beiden Lysaten vorhanden (Abb. 8 B vergleiche Spuren 1 und 4). Auch nach dem Reinigungsschrill war die Tubulinkonzentration in den beiden Ansätzen nahezu identisch (Abb. 8 B vergleiche Spuren 2 und 5). Die Mikrotubuli waren nach der letzten Ultrazentrifugation gleich gut in den beiden Pelletfraktion angereichert (Abb. 8 B vergleiche Spuren 3 und 4). Die beiden Rezeptorvarianten lagen in ungefähr gleicher Konzentration in den Extrakten vor (Abb. 8 A vergleiche Spuren 1 und 4). Beim Vergleich der Pelletfraktionen zeigte sich jedoch, daß der Rezeptor mit langer Glutaminsequenz zu einem wesentlich geringeren Maß mit Mikrotubuli kosedimentierte (Abb. 8 vergleiche Spur 3 und 6). Diese Ergebnisse bestätigen den im Affinitätschromatographie-Experiment erhaltenen Befund (Abschnitt 3.3), daß ein Fragment des AR mit einer Homopolymerfolge von 45 Glutaminresten wesentlich schlechter mit Tubulin interagierte als ein Fragment mit einer Homopolymerfolge von 22 Glutaminresten.

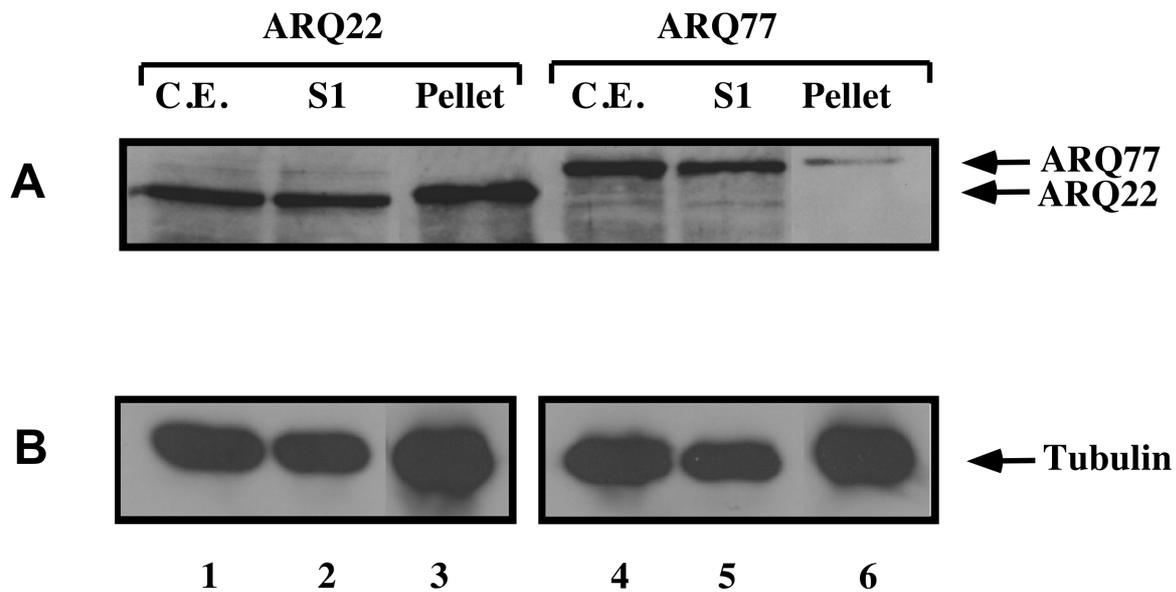


Abb. 8 Der ARQ77 interagiert zu einem geringeren Maß mit Mikrotubuli als der ARQ22. Kosedimentationsexperiment mit ARQ22 bzw. ARQ77 und Mikrotubuli. Cos-7 Zellen wurden durch Elektroporation mit den ARQ22 und ARQ77 Konstrukten transient transfiziert. Dabei erfolgte die Transfektion und die anschließende Behandlung der Zellen wie unter Abb. 7 beschrieben. Im Unterschied zu dem in Abb. 7 gezeigten Versuch wurde keine Coomassiefärbung des Gels nach der elektrophoretischen Auftrennung der Extrakte vorgenommen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran überführt. (A) Die Membran wurde mit dem anti-AR44 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem HRP gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. (B) Die Bestimmung der relativen Tubulinmengen erfolgte bei diesem Versuch mittels semiquantitativen *Westernblots*. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Fraktionen wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt und mit dem monoklonalen anti- β -Tubulin Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem HRP gekoppelten anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte in (A) und (B) mittels ECL.

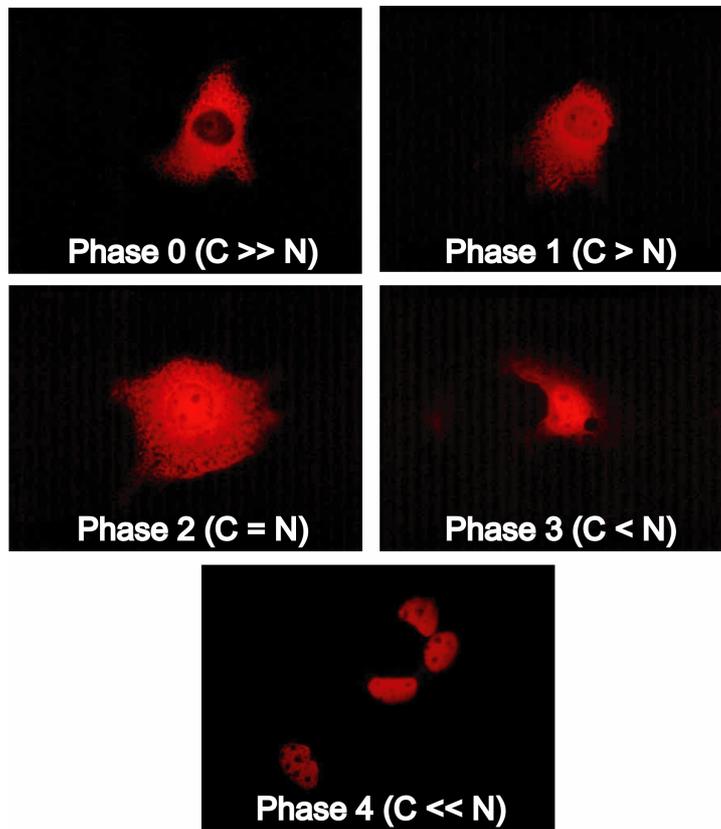
3.6 Hormon abhängige und unabhängige Lokalisierung des AR in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge

Mikrotubuli spielen nicht nur bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und beim Vorgang der Zellteilung eine wichtige Rolle. Mikrotubuli (MTs) sind auf einzigartige Weise für die Weiterleitung von cytoplasmatischen Signalen in den Kern geeignet. Sie füllen den größten

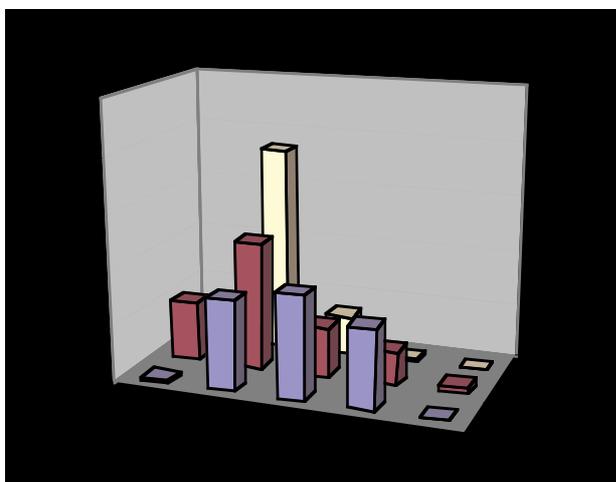
Teil des cytoplasmatischen Raumes aus und durchspannen die Distanz von der Zellmembran zum Nukleus. In den meisten Zellen assoziieren ihre Minusenden mit dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC). Auf diese Weise verleihen sie jeder Zelle eine definierte Polarität (zur Übersicht Gundersen und Cook, 1999). Zusätzlich stellen MTs eine enorme Oberfläche innerhalb der Zelle dar (durchschnittlich $1000 \mu\text{m}^2$). Diese große Oberfläche wird für Protein-Protein-Interaktionen genutzt. Der AR ist ohne Hormon hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert und transloziert nach Hormonbindung in den Kern. Eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Hormon freien cytoplasmatischen Lokalisierung bzw. Hormon abhängigen Translokation des AR wäre vorstellbar. Aus den beschriebenen Affinitätsunterschieden des AR zu Mikrotubuli in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymerfolge könnte also eine veränderte subzelluläre Lokalisierung des Rezeptors folgen.

Es wurde also zunächst untersucht, welchen Effekt die Länge der Glutaminhomopolymerfolge auf die Hormon abhängige bzw. unabhängige Lokalisierung des AR hatte. Dies wurde erreicht, in dem Cos-7 Zellen mit Androgenrezeptorkonstrukten mit unterschiedlich langen Glutaminhomopolymerfolgen (Q1, Q22, Q77) transfiziert wurden. Die ligandenabhängige und –unabhängige subzelluläre Lokalisierung der immuncytochemisch gefärbten Rezeptorvarianten wurde anschließend bestimmt. Um die Quantifizierung und die statistische Beschreibung der Lokalisierungszustände zu ermöglichen, wurde, wie in Abb. 9 A gezeigt, eine Einteilung der Lokalisierungszustände des immuncytochemisch gefärbten AR in fünf Phasen definiert. Dabei beschreibt Phase null die ausschließlich cytoplasmatische Lokalisierung des AR, in Phase eins ist ein Teil des Rezeptors im Kern nachweisbar, während der größte Teil im Cytoplasma lokalisiert ist. In Phase zwei ist kein Unterschied zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Lokalisierung festzustellen, Phase drei beschreibt die weitgehende Lokalisierung des Rezeptors im Kern, Phase vier steht für die ausschließliche Kernlokalisierung des AR.

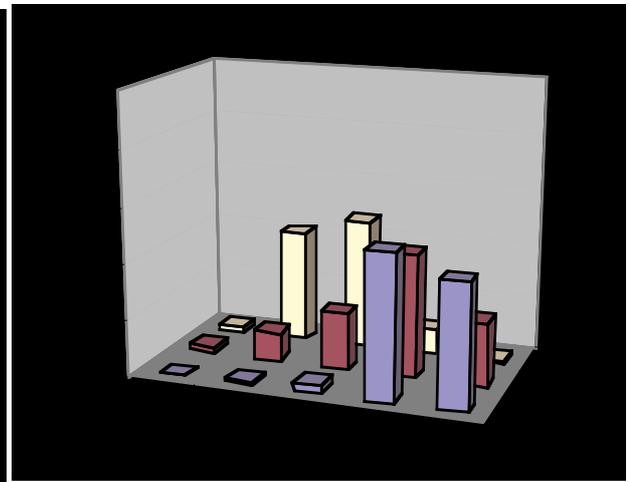
A



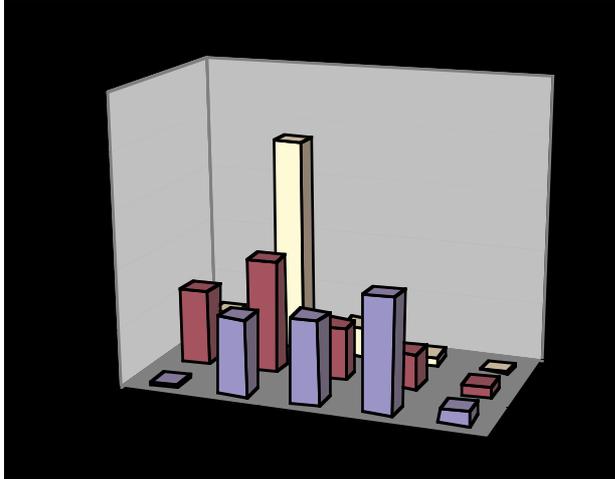
B



C



D



E

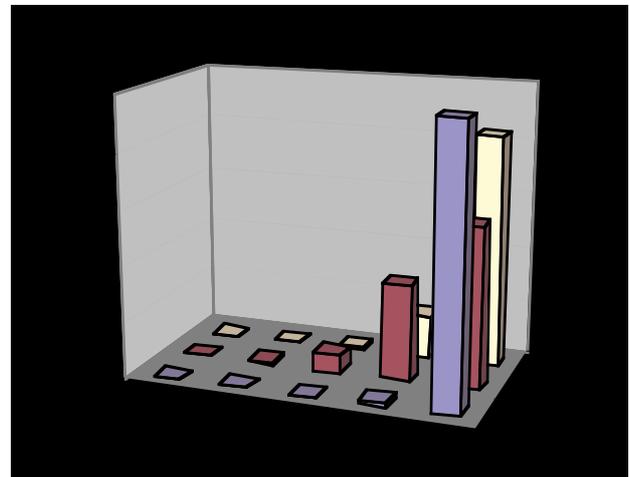


Abb. 9 Bestimmung der Hormon abhängigen und unabhängigen subzellulären Lokalisierung des AR in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminsequenz. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Nach 24 stündiger Kultivierung der Zellen in DMEM 10 % FCS wurden die Zellen mit je $1,5 \mu\text{g}$ der ARQ77-, ARQ22- oder ARQ1-Expressionsvektoren pro Ansatz transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h in DMEM ohne Phenolrot mit 3% Aktivkohle behandeltem bovinem Serum (CCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis inkubiert. Nach weiteren 5 min erfolgte die Zugabe von DHT (Endkonzentration 100 nM) bzw. des Lösungsmittels Ethanol (0,08 % (v/v)). Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 0,5 h bzw. 1,5 h im Inkubator kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und anschließend mit dem polyklonalen anti-AR Antikörper AR44 inkubiert. Nach der Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper erfolgte die Betrachtung der Proben unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert 135). Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde nach der Detektierbarkeit eines eindeutig sich vom Hintergrund abhebenden Fluoreszenzsignals bestimmt. (A) Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Lokalisierungsphasen wurden zunächst beispielhaft Zellen in den 5 unterschiedlichen Phasen fotografiert. Die unterschiedlichen Phasenwerte sind am unteren Bildrand angegeben. C steht für Cytoplasma, N für Nukleus. Die Zellen wurden mit 1000 x Vergrößerung aufgenommen. Die Auszählung erfolgte nach der in (A) gezeigten Phaseneinteilung. Es wurden je Behandlungsart, Konstrukt und Zeitpunkt insgesamt ca. 900 Zellen in drei unabhängigen Versuchen ausgezählt (insgesamt ca. 11000 Zellen). Die Ergebnisse sind in Form von Balkendiagrammen dargestellt. (B) Lokalisierung der unterschiedlichen AR Varianten nach 30 min unter Kontrollbedingungen (0,08% (v/v) Ethanol). (C) Lokalisierung der AR Varianten nach 30 min Behandlung der COS-7 Zellen mit DHT (100 nM). (D) Lokalisierung der AR Varianten nach 1,5 h unter Kontrollbedingungen. (E) Lokalisierung der AR Varianten nach 1,5 h Behandlung der Cos-7 Zellen mit DHT.

Die Beobachtung der subzellulären Lokalisierung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten erfolgte nach 0,5 h und 1,5 h. Im semiquantitativen *Westernblot* wurde für jede Auszählung die jeweils exprimierte Menge der unterschiedlichen Rezeptoren überprüft (nicht gezeigt). In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden insgesamt 11000 Zellen ausgezählt. Eine Möglichkeit diese Ergebnisse darzustellen, ist die Auflistung der durchschnittlichen Translokationswerte in tabellarischer Form. Diese Darstellungsform bietet die Möglichkeit die Standardabweichung der einzelnen Ergebnisse übersichtlich zu präsentieren. Die im Appendix aufgeführte Tabelle 3 enthält eine Auflistung der durchschnittlichen Phasenwerte aus den drei durchgeführten Zählungen. Aus den angegebenen Standardabweichungen ist ersichtlich, daß es zwischen den einzelnen Zählungen nur geringe Abweichungen gab. Zur übersichtlichen Verdeutlichung der Lokalisierungszustände wurde jedoch die graphische Darstellung (Abb. 9 B-E) der durchschnittlichen prozentualen Phasenverteilung der unterschiedlichen Rezeptortypen zu den zwei untersuchten Zeitpunkten in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von DHT gewählt. Bei der Quantifizierung der subzellulären Verteilung der unterschiedlichen Glutaminsequenz modifizierten Rezeptortypen ergab sich in Abwesenheit des Hormons (0,5 h bzw. 1,5 h) ein deutlicher Unterschied. Für den Rezeptor mit 22 Glutaminresten (ARQ22) ergab sich eine hauptsächlich cytoplasmatische Verteilung des Proteins, wobei sich aber ein nicht unerheblicher Anteil bereits im Nukleus nachweisen ließ (Abb. 9 B und D, 32,1 % nach 0,5 h bzw. 34,5 % nach 1,5 h in Phase zwei oder darüber). Der Rezeptor mit 77 Glutaminresten (ARQ77) zeigte gegenüber dem Wildtyp eine leicht betonte cytoplasmatische Lokalisierung. Er befand sich nach 0,5 h zu 14,9 % bzw. nach 1,5 h zu 13,8 % in Phase zwei oder darüber (Abb. 9 B und D). Die ARQ1 exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu den Zellen die den ARQ22 bzw. den ARQ77 exprimierten im nicht induzierten Zustand eine deutlich stärkere nukleäre Lokalisierung des Rezeptors. ARQ1 befand sich nach 0,5 h und 1,5 h zu über 50 % in Phase zwei oder darüber (Abb. 9 B und D). Nach Hormongabe zeigte sich ein deutlicher Einfluß der Länge der Glutaminsequenz auf die Translokation des Rezeptors. In der graphischen Darstellung der Hormon abhängigen nukleären Translokation der drei Rezeptorvarianten ist die verlangsamte Bewegung des ARQ77 verdeutlicht (Abb. 9 C). Im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptortypen

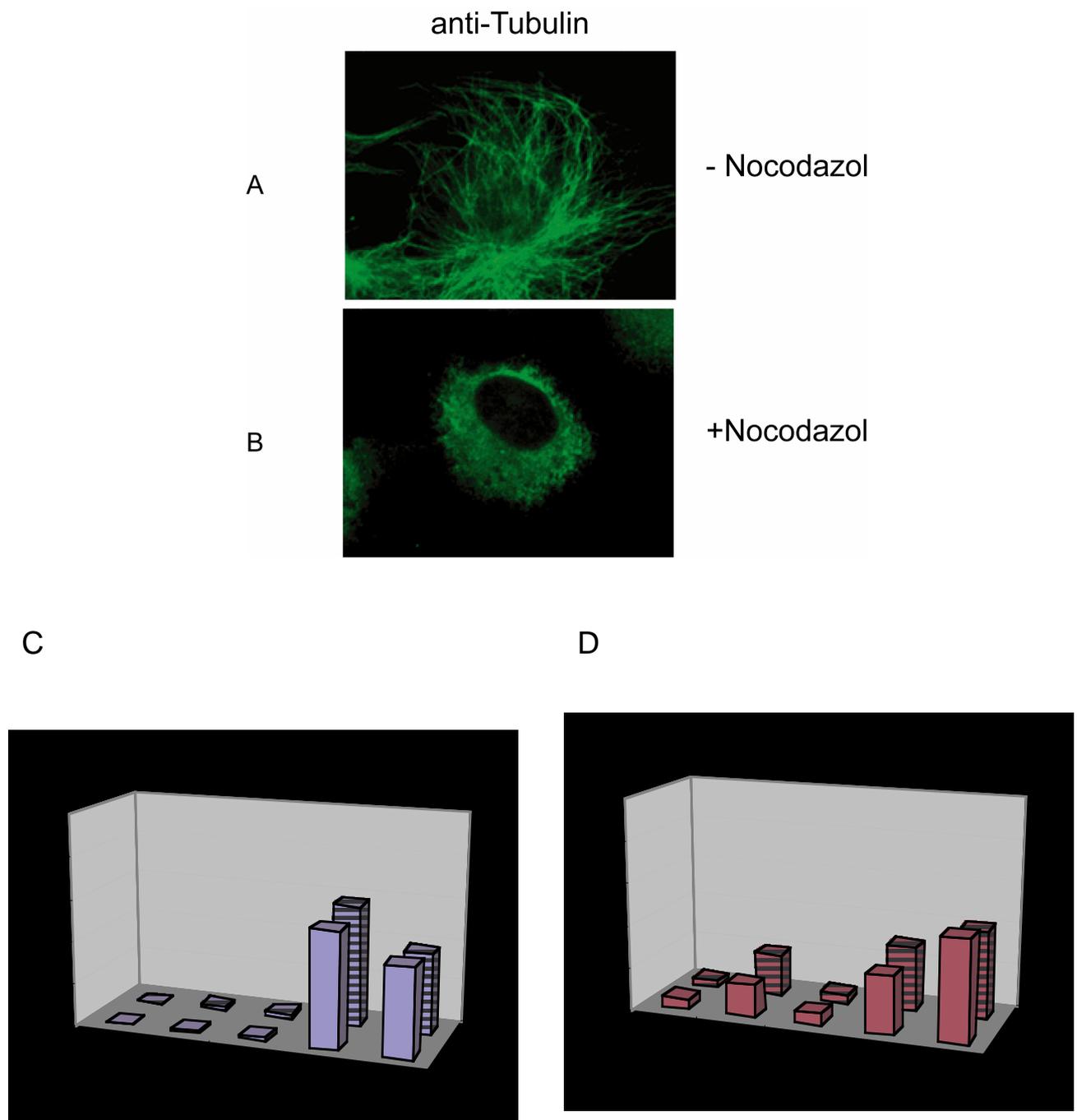
lokalisierte der ARQ77 zu 89,5 % in Phase eins bzw. zwei, während sich ARQ22 und ARQ1 bereits zum überwiegenden Teil in Phase drei bzw. vier befanden (Abb. 9 C; ARQ1 96,2 %, ARQ22 67,4 %). Dabei fiel auf, daß die nukleäre Lokalisierung des ARQ1 mit einem Anteil von 44,5 % in Phase vier deutlich gegenüber den 22,6 % in Phase vier des ARQ22 betont war (Abb. 9 C). Nach 1,5 h war die Kernwanderung bei den drei unterschiedlichen Rezeptoren größtenteils abgeschlossen. ARQ1 befand sich zu 98,5 % und ARQ77 zu 83,3 % in Phase vier. Im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptorvarianten war ein relativ hoher cytoplasmatischer Anteil des ARQ22 auffällig, der noch zu 34,6 % in Phase drei und zu 6,6 % in Phase zwei nachzuweisen war (Abb. 9 E).

Die Länge der Glutaminhomopolymerfolge im AR hat also einen Einfluß auf die Hormon unabhängige Lokalisierung und die Hormon induzierten Bewegung des Rezeptors in den Kern. Dies wurde bei der Hormon freien Situation besonders durch die, im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptortypen, stark nukleäre Lokalisierung des ARQ1 und bei der Hormon induzierten Situation durch die verlangsamte Translokation des ARQ77 deutlich. Ob aber nun das *in vitro* beobachtete, im Vergleich zu ARQ22 verminderte, Bindungsverhalten des ARQ77 an Mikrotubuli für die verlangsamte nukleäre Translokation des ARQ77 verantwortlich war wurde in einem weiteren Experiment geklärt.

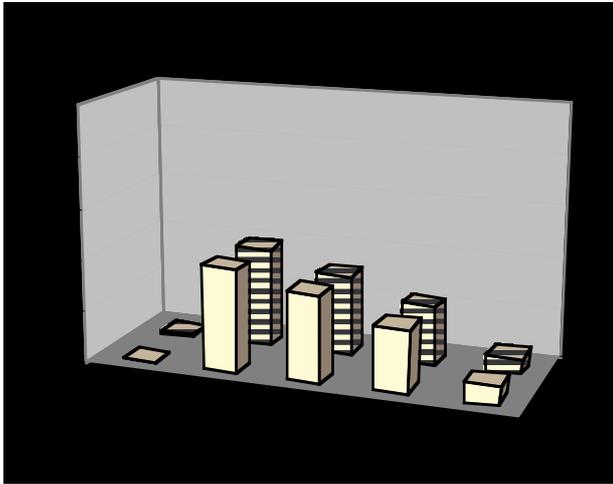
3.7 Lokalisierung des AR in Abhängigkeit von Mikrotubuli

Eine Möglichkeit die Struktur von Mikrotubuli in einer lebenden Zelle zu zerstören bietet die Behandlung mit spezifisch destabilisierend wirkenden Substanzen wie z.B Nocodazol. Um die Wirksamkeit dieser Substanz zu überprüfen wurden Cos-7 Zellen für 0,5 h mit Nocodazol bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach dem Fixieren der Zellen erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen anti- β -Tubulin Antikörper gefolgt von der Inkubation mit einem Fluorescein Isothiocyanat (FITC) markierten anti-Maus Antikörper. Abb. 10 A zeigt die filigrane Struktur der Mikrotubuli in einer unbehandelten Zelle. Der Kern ist dabei ausgespart. Nach der Behandlung mit Nocodazol löste sich die filamentäre Struktur der Mikrotubuli auf.

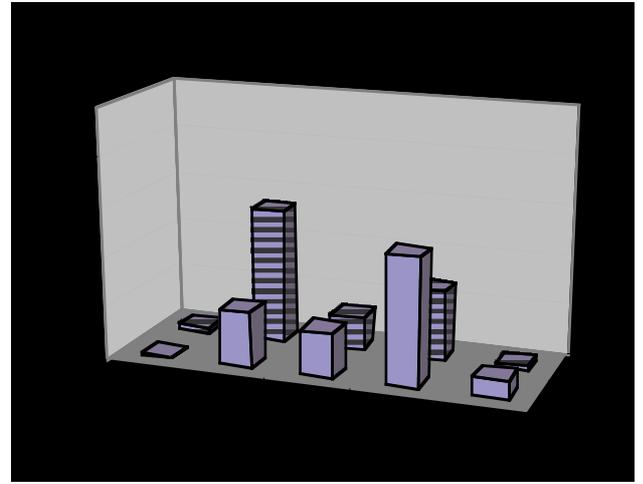
Es ergab sich eine gleichmäßig cytoplasmatische Verteilung des Tubulins, wobei auch hier der Kern ausgespart blieb (Abb. 10 B).



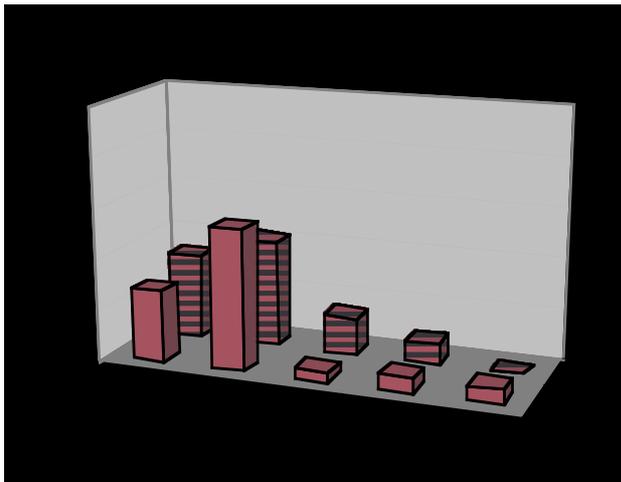
E



F



G



H

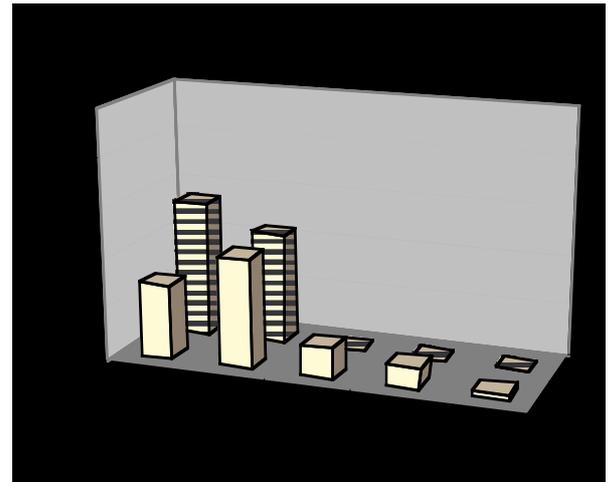


Abb. 10 Bestimmung der subzellulären Lokalisierung des AR in Abhängigkeit von Mikrotubuli. Cos-7 Zellen wurden mit den ARQ1, ARQ22 und ARQ77 Konstrukten transfiziert. Die Transfektion und die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter Abb.9 beschrieben, mit dem Unterschied, daß 25 min nach der Hormongabe die Zellen zusätzlich für die restlichen 30 min mit Nocodazol (0,4 µg/ml) oder dem Lösungsmittel DMSO 0,01% auf Eis inkubiert wurden. Nach der Methanolfixierung der Zellen wurden sie mit dem monoklonalen anti-β-Tubulin Antikörper und dem polyklonalen anti-AR44 Antikörper inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem TRITC markierten anti-Kaninchen und einem FITC gekoppelten anti-Maus Antikörper. (A)+(B) zeigen die Epifluoreszenzaufnahmen des FITC markierten Tubulins. (A) Aufnahme einer kontrollbehandelten Zelle: Die filamentären Mikrotubuli durchspannen die gesamte Zelle; (B) Aufnahme einer Nocodazol behandelten Zelle: Nocodazol zerstört die filamentäre Struktur der Mikrotubuli und

führt zu einer gleichmäßigen cytoplasmatischen Verteilung des Tubulins in der Zelle. (C) - (H) Die Auszählung der Lokalisationsphasen des AR erfolgte wie unter Abb. 9 beschrieben. In jedem Diagramm sind die Phasenverteilung für jeweils ein Konstrukt nach Hormon- bzw. Kontrollbehandlung gezeigt. Die nach Nocodazolbehandlung erhaltene Verteilung ist im jeweiligen Diagramm durch die gestreiften Balken in der entsprechenden Farbe dargestellt. Die Behandlungsart ist an der y-Achse angegeben. (C) Translokation des ARQ1 nach 0,5 h DHT Behandlung; (D) ARQ22 nach 0,5 h DHT Behandlung; (E) Translokation des ARQ77 nach 0,5 h DHT Behandlung; (F) Lokalisierung des ARQ1 nach 0,5 h ohne Hormonbehandlung; (G) Lokalisierung des ARQ22 nach 0,5 h ohne Hormonbehandlung; (H) Lokalisierung des ARQ77 nach 0,5 h ohne Hormonbehandlung.

Um die Hormon abhängige bzw. unabhängige Lokalisierung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten in Zellen mit bzw. ohne Mikrotubuli zu untersuchen, wurden Cos-7 Zellen zunächst mit den unterschiedlichen Rezeptorkonstrukten ARQ1, ARQ22 und ARQ77 transfiziert und anschließend mit Nocodazol behandelt. Die entsprechenden Kontrollansätze wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist für den Zeitpunkt 0,5 h in graphischer Form dargestellt (Abb. 10 C - H; siehe auch Tabelle 4 A im Appendix). Bei der Betrachtung der Kontrollansätze ergab sich erneut eine deutlich verzögerte Hormon abhängige Kerntranslokation des ARQ77 (Vergleiche Abb. 10 E mit Abb. 9 C). Er befand sich nach 0,5 h zu über 50 % in Phase zwei und darunter wohingegen ARQ22 und ARQ1 zu über 50 % in Phase drei und darüber zu finden waren (Abb. 10 C und D). Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol hatte keinen Einfluß auf die Hormon abhängige Translokation der Rezeptoren. Nach Zerstörung der Mikrotubuli war im Vergleich zu den Kontrollansätzen kein deutlicher Unterschied in Bezug auf die jeweilige Hormon abhängige subzelluläre Verteilung aller Rezeptorvarianten festzustellen (Abb. 10 C – E vergleiche jeweils –Noc und +Noc). Im Gegensatz hierzu zeigten sich deutliche Unterschiede in der nicht Hormon behandelten Situation. Besonders deutlich werden diese Unterschiede bei der Betrachtung der prozentualen Phasenverteilung der mit ARQ1 transfizierten Zellen (Abb. 10 F). Während sich im DMSO behandelten Ansatz 22,2 % in Phase eins oder null befanden waren im Nocodazol behandelten Ansatz 56,9 % in Phase eins oder null. Weiterhin zeigte sich ein leichter Unterschied für den ARQ77 (Abb. 10 H). Die prozentuale Verteilung der Zellen in

den unterschiedlichen Phasen ergab für den ARQ77 einen Anteil von 73,6 % in Phase null und eins. Im Vergleich hierzu befanden sich im Nocodazol behandelten Ansatz 99,7 % in Phase null und eins (Abb. 10 H). Einzig der ARQ22 zeigte in beiden Ansätzen keine unterschiedliche subzelluläre Verteilung. Im mit DMSO behandelten Ansatz befanden sich 84,4 % und im Nocodazol behandelten Ansatz 76,5 % in Phase null und eins (Abb. 10 G). Die Zerstörung der Mikrotubuli hatte auch nach 1,5 h keinen Einfluß auf die Hormon vermittelte Translokation des Rezeptors (Ergebnisse in Tabelle 4 B im Appendix). Die Kernwanderung des ARQ1, ARQ22 bzw. ARQ77 war zu diesem Zeitpunkt unabhängig von der Behandlung mit Nocodazol nahezu vollständig abgeschlossen. Wie in den nicht mit Hormon behandelten 0,5 h-Ansätzen zeigte sich auch nach 1,5 h ein deutlicher Unterschied zwischen dem Kontrollansatz und dem Nocodazol behandelten Ansatz für die Lokalisierung des ARQ1. Im Gegensatz zu dem 0,5 h Wert konnte zu diesem Zeitpunkt beim ARQ77 kein Unterschied in der Hormon unabhängigen Lokalisierung festgestellt werden. Auch der ARQ22 zeigte nach 1,5 h keine Unterschiede in seiner Hormon unabhängigen subzellulären Lokalisierung. Die Zerstörung der Mikrotubuli hatte also keinen Einfluß auf die Hormon induzierte Wanderung der AR Varianten. Ein deutlicher Unterschied in der subzellulären Lokalisierung ergab sich nur für den ARQ1 bei den nicht Hormon behandelten Ansätzen. Dieses Ergebnis läßt auf eine Beteiligung von Mikrotubuli an der nicht Hormon abhängigen subzellulären Verteilung des ARQ1 schließen. Die beobachteten Hormon unabhängigen Unterschiede der subzellulären Verteilung des ARQ77 wurden nur nach 0,5 h Nocodazolbehandlung festgestellt. Für den ARQ22 ließ sich weder in der Hormon behandelten noch in der nicht Hormon behandelten Situation ein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von Mikrotubuli feststellen. Aus diesem Befund folgte, daß die deutlich verlangsamte Hormon abhängige nukleäre Translokation des ARQ77 nicht auf der *in vitro* gefundenen verminderten Interaktion des Rezeptors mit Mikrotubuli zurückzuführen war. Für die verminderte Translokationsgeschwindigkeit müssen also weitere Faktoren verantwortlich sein.

3.8 Bildung cytoplasmatischer Aggregate nach Hormoniduktion in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminhomopolymersequenz des Androgenrezeptors

Während der Untersuchung der subzellulären Lokalisierung des Rezeptors fielen unterschiedliche Formen von cytoplasmatischen Aggregaten auf. In ungefähr 2-3 % der mit den unterschiedlichen AR Varianten transfizierten Cos-7 Zellen waren unabhängig von einer Hormongabe und der Länge der Glutaminsequenz kompakte Strukturen zu finden. Abb. 11 A-C zeigt exemplarisch für alle transfizierten Rezeptortypen eine mit ARQ22 transfizierte Cos-7 Zelle. Abb. 11 A zeigt die immunocytochemische Fluoreszenzfärbung des ARQ22 mit einem polyklonalen anti-AR Antikörper. Deutlich ist die kompakte Struktur des durch den AR gebildeten Aggregates zu erkennen. Wie in der differentiellen Interferenzkontrast (DIC) –Aufnahme der gleichen Zelle in Abb. 11 B zu erkennen ist, waren die Aggregate immer epinukleär lokalisiert. Sie füllten oft einen großen Teil des cytoplasmatischen Kompartimentes aus. Die Überlagerung beider Bilder bestätigt die Kollokalisierung des AR-Signals mit der mittels DIC erkennbaren Struktur (Abb. 11 C).

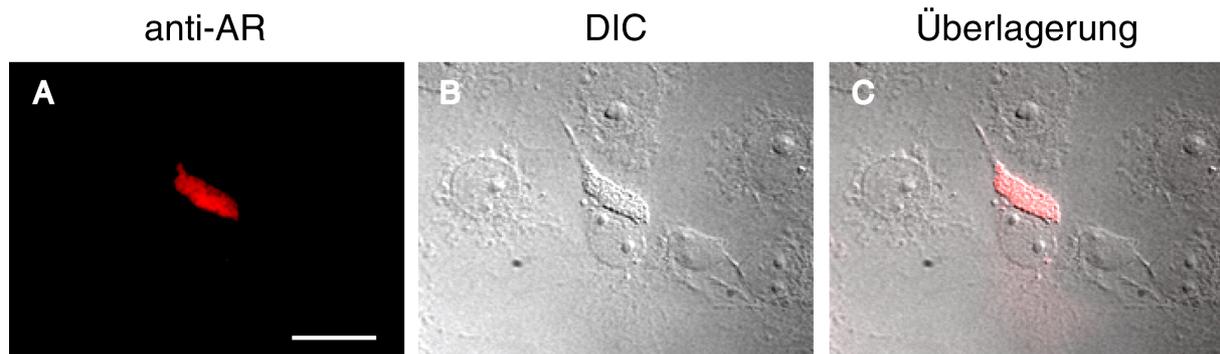


Abb. 11 Repräsentative Darstellung der durch den AR unabhängig von der Länge der Glutaminsequenz und der Behandlung mit DHT gebildeten cytoplasmatischen Aggregate. Jeweils 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen verteilt und in DMEM Medium (10 % FCS) kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit je 1,5 μg des ARQ22-Konstruktes transfiziert und für weitere 24 h in DMEM Medium (10 % FCS) kultiviert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen 24 h in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % C CS) gehungert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Solvenz (0,08 % (v/v) Ethanol). Die Zellen wurden nach der Methanolfixierung mit dem polyklonalen anti-AR44 Antikörper inkubiert. Dieser wurde durch den TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper detektiert. Nach der Montage der Deckgläschen unter Einschlußmedium auf Objektträgern erfolgte die Betrachtung der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 135). (A) Epifluoreszenzaufnahme des mit TRITC markierten Androgenrezeptors. (B) differenzielle Interferenzkontrastaufnahme (DIC) der gleichen Zelle. (C) Überlagerung der beiden Bilder. Der Balken entspricht 15 μm .

Im Gegensatz zu diesen Strukturen fand man aber AR positive Zellen, in denen ausschließlich Hormon induzierte cytoplasmatische Aggregate bereits eine halbe Stunde nach Hormongabe zu erkennen waren (Abb. 12 A, D, G). Dabei zeigten sich strukturelle Unterschiede zwischen den Aggregaten in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge der jeweils transfizierten Rezeptorvariante. Der ARQ22 formte kleine, punktförmige Aggregate in großer Zahl, die sich über die Zeit nur wenig in ihrer Größe änderten (Abb. 12 D-F). Im Unterschied dazu zeigten sich bei ARQ77 transfizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt pro Zelle weniger, dafür aber größere Aggregate. Nach drei Stunden ließen sich Zellen mit sehr großen, beerenförmigen Strukturen beobachten (Abb. 12 I). Bei ARQ1 transfizierten Zellen war die Menge an Aggregaten pro Zelle deutlich niedriger, als bei den Zellen, die mit den anderen beiden Konstrukten transfizierten waren.

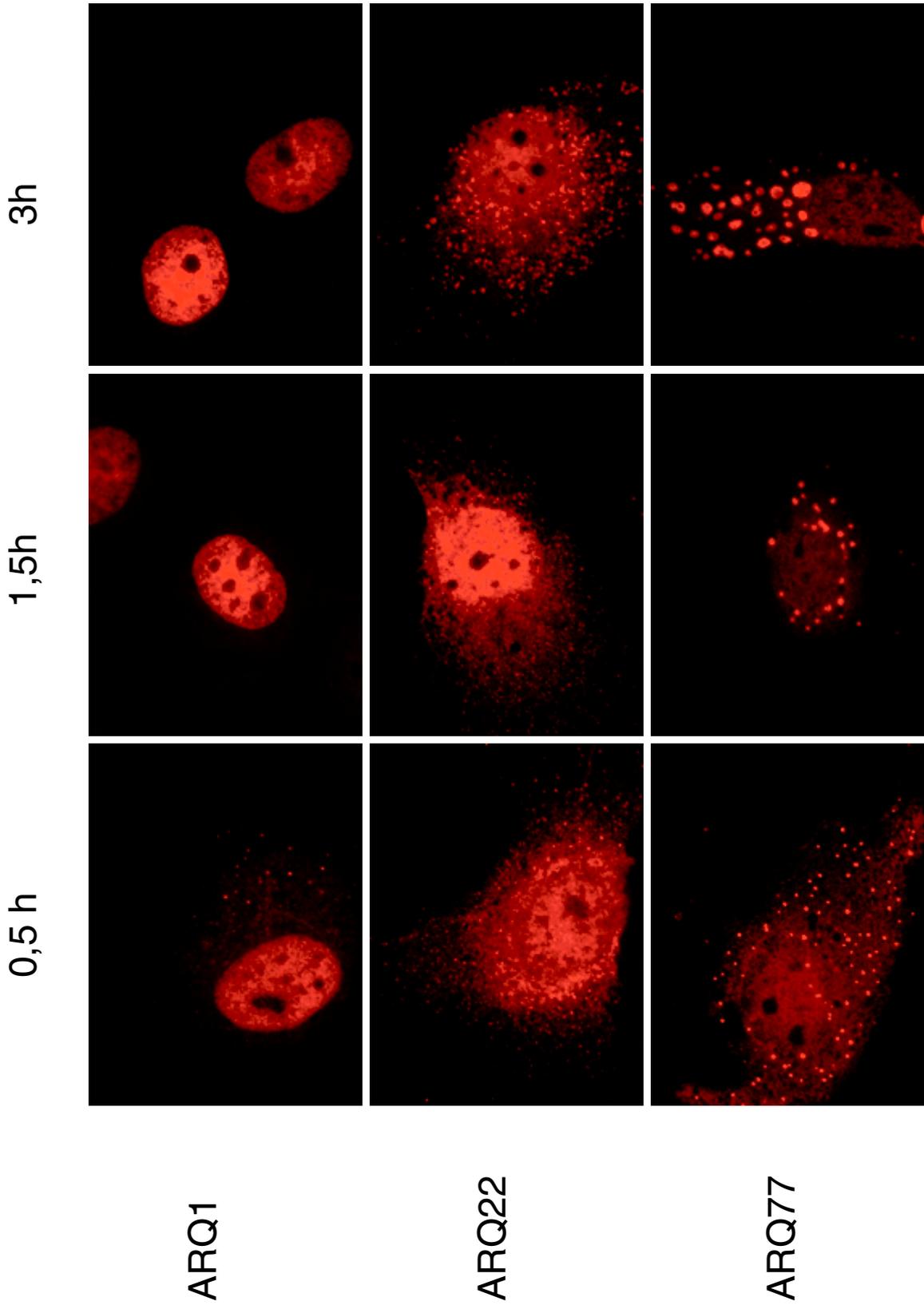


Abb. 12 Zeitlicher Verlauf der Aggregatbildung durch Androgenrezeptoren mit unterschiedlicher Glutaminsequenzlänge. Jeweils 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen verteilt und in DMEM Medium (10 % FCS) kultiviert. 24 h danach wurden die Zellen mit je 1,5 μg der ARQ1-, ARQ22- und ARQ77-Konstrukte transfiziert und für weitere 24 h in DMEM Medium (10 % FCS) kultiviert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen 24 h in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) gehungert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit DHT (100 nM) oder Solvenz (0,08 % (v/v) Ethanol) für die am oberen Rand angegebenen Zeitspannen. Anschließend an die Behandlung wurden die Zellen methanolfixiert und mit dem polyklonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation der Zellen mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen in Einschlußmedium auf Objektträger montiert. Die Betrachtung und Dokumentation der Zellen erfolgte an einem Zeiss Axiovert 135 Epifluoreszenz Mikroskop. Die transfizierten Konstrukte sind am linken Rand angegeben. **A-C**, ARQ1; **D-F**, ARQ22, **G-H** ARQ77. Der Balken entspricht 15 μm .

Aussehen und Größe der ARQ1-Aggregate war hierbei mit den Strukturen vergleichbar, die von ARQ22 gebildet wurden (Abb. 12 A, vergleiche mit Abb. 12 D-F). Abb. 13 verdeutlicht den strukturellen Unterschied zwischen den beiden gefundenen Aggregatformen. Die mittels differenziellen Interferenzkontrast (DIC, Abb. 13 E,) gemachte Aufnahme zeigt deutlich die beerenförmige Struktur der durch ARQ77 gebildeten Aggregate (Abb.13 E, schwarzer Pfeil). Die immunocytochemische Färbung des AR bestätigte die Lokalisierung des AR in diesen Strukturen. Neben den „Beeren,, waren aber auch singuläre, ringförmige Strukturen zu erkennen (Abb. 13 E, weißer Pfeil). Nach 0,5 bzw. 1,5 h wurde eine Auszählung der Aggregat positiven Zellen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Zählung ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. Nach 0,5 h Hormonbehandlung ließen sich nur geringfügig mehr Aggregat positive Zellen bei ARQ77 transfizierten Zellen im Vergleich zu ARQ22 transfizierten Zellen finden (13,5 % bzw. 11,1 %, Tab. 3 A). Die Anzahl der durch ARQ1 gebildeten Aggregat aufweisenden Zellen war gegenüber den beiden anderen Rezeptortypen deutlich reduziert (5 %, Tab. 2 A). Diese Zellen waren bereits nach 1,5 h nicht mehr zu finden, während nach dieser Zeitspanne die Aggregat positiven Zellen bei ARQ22 bzw. ARQ77 transfizierten Zellen in nahezu unveränderter Anzahl zu finden waren (Tab. 2 B). In der Anzahl der betroffenen Zellen zeigten sich also nur geringe Unterschiede zwischen ARQ22 und ARQ77 (Tab. 2 B).

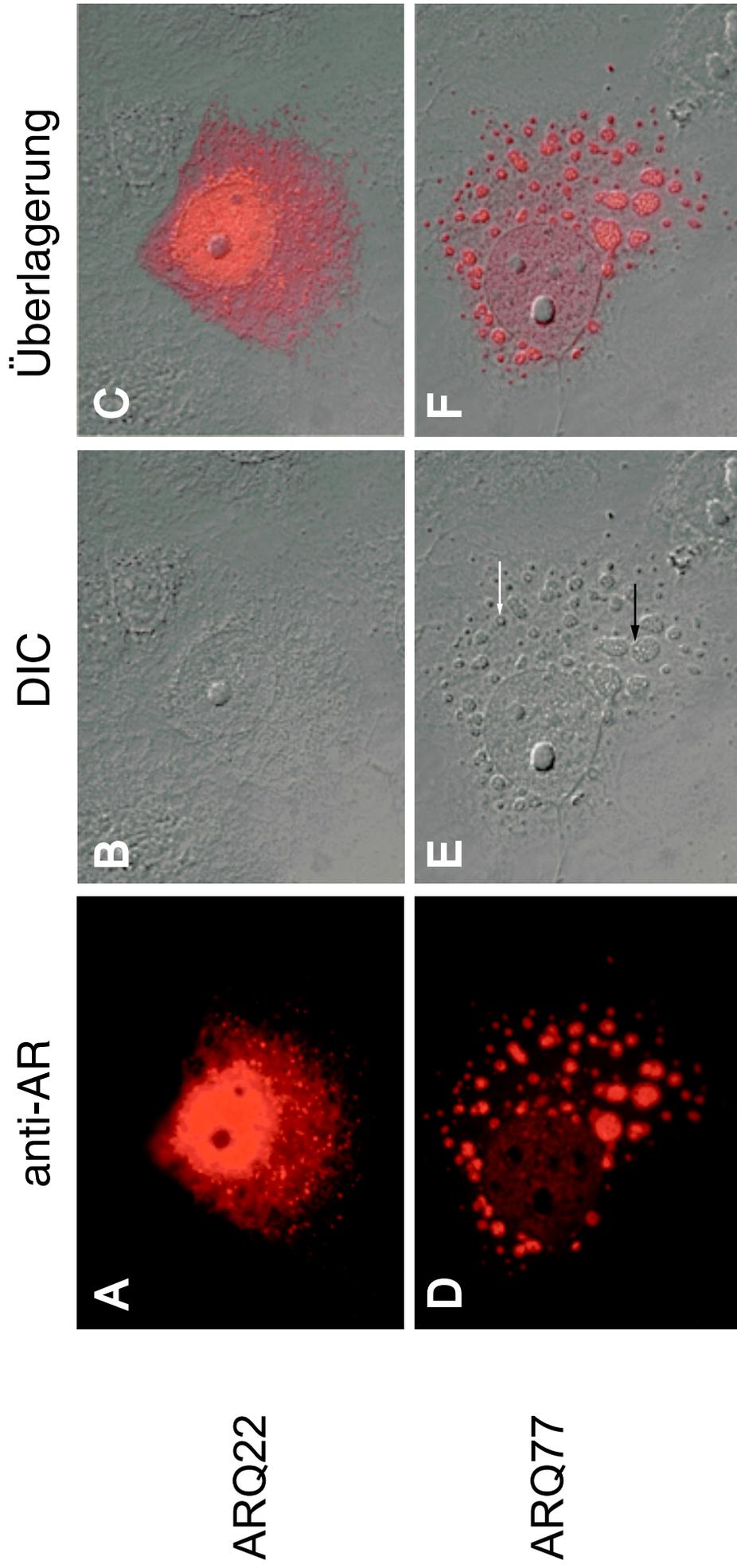


Abb. 13 Der ARQ77 formt große runde bis beerenförmige Aggregate, die sich deutlich von den durch den ARQ22 gebildeten kleinen punktförmigen Strukturen unterscheiden. Vergleich der durch ARQ22 bzw. ARQ77 nach 3 h Hormonbehandlung gebildeten Strukturen. Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten ARQ22 und ARQ77 transfiziert. Die Kultivierung, Transfektion und Behandlung der Zellen mit DHT (10 nM) und Solvenz (0,08 % (v/v) Ethanol) erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben. Die Immunfluoreszenzfärbung und Betrachtung der Zellen erfolgte ebenfalls wie unter Abb. 12 angegeben. Die jeweils transfizierten Konstrukte sind am linken Bildrand angegeben. **A-C**, ARQ22, **D-F**, ARQ77. **A** und **D** Immunfluoreszenzaufnahme. **B** und **E** differenzielle Interferenzkontrastaufnahme. **C** und **F** Überlagerung der beiden Aufnahmen. Der Balken entspricht 15 µm.

Tab. 2 A: Auswirkung der Glutaminsequenzlänge auf die Bildung cytoplasmatischer Aggregate 0,5 h nach Hormongabe

	Anzahl transfizierter Zellen	Zellen mit cytoplasmatischen Aggregaten	
		n	%
ARQ1	1420	71	5
ARQ22	1410	157	11,1
ARQ77	1102	145	13,5

Tab. 2 B: Auswirkung der Glutaminsequenzlänge auf die Bildung cytoplasmatischer Aggregate 1,5 h nach Hormongabe

	Anzahl transfizierter Zellen	Zellen mit cytoplasmatischen Aggregaten	
		n	%
ARQ1	989	0	0
ARQ22	936	108	11,5
ARQ77	1020	116	11,3

Cos-7 Zellen wurden mit gleichen Mengen von ARQ77, ARQ22 oder ARQ1 Vektoren transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24h in Dulbecco's modifiziertem *Eagle* Medium (DMEM) ohne Phenolrot mit 3% Aktivkohle behandeltem bovinem Serum (CCS) inkubiert. Anschließend erfolgte die

Inkubation mit 100nM Dihydrotestosteron (DHT) für 0,5 h (**A**) bzw. 1,5 h (**B**). Die Zellen wurden fixiert und anschließend mit dem polyklonalen anti-AR Antikörper AR44 inkubiert. Nach der Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper erfolgte die Betrachtung der Proben unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde nach der Detektierbarkeit eines eindeutig sich vom Hintergrund abhebenden Fluoreszenzsignals bestimmt. Der prozentuale Anteil der Aggregat positiven Zellen wurde bestimmt. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die Gesamtmenge aus jeweils drei unterschiedlichen Experimenten. Die AR-Menge wurde in quantitativen *Immunoblots* bestimmt, um eine gleich starke Expression der unterschiedlichen Konstrukte zu überprüfen (nicht gezeigt).

Die Beobachtung der transfizierten Zellen über einen längeren Zeitraum ergab, daß 16 h nach der Hormongabe noch immer AR positive Zellen in großer Zahl vorhanden waren, die eine nukleäre Lokalisierung des Rezeptors zeigten. Nach dieser Zeitspanne waren jedoch bei keinem der unterschiedlichen Rezeptortypen Zellen mit Aggregaten im Cytoplasma zu finden. Die in diesem Absatz besprochenen Daten zeigen, daß es nach Hormongabe zur Bildung von Aggregaten durch den AR kommt. Dabei war die Häufigkeit und die Struktur der Aggregate von der Länge der Glutaminsequenz abhängig. Auch die Nocodazolbehandlung der mit den unterschiedlichen Konstrukten transfizierten Cos-7 Zellen hatte keinen Einfluß auf die Kinetik der Aggregatentstehung, die Größe der Aggregate oder die Anzahl der Aggregat positiven Zellen.

3.9 Die Verkürzung des Androgenrezeptors verhindert die Bildung cytoplasmatischer Aggregate

Merry *et al.*, 1998 berichten in einer immunocytochemischen Studie mit Cos-7 Zellen über die Bildung großer cytoplasmatischer Aggregate 48 h nach Transfektion verkürzter Konstrukte des AR mit einer 65 bzw. 112 Glutaminreste umfassenden Homopolymerfolge. Dabei wurde die Bildung von Aggregaten in 45 % bzw. 35 % der transfizierten Zellen beobachtet, während ein Fragment mit nicht pathogener Sequenzlänge nur eine gleichmäßige cytoplasmatische Verteilung zeigte. Es wurde überprüft, ob die Expression eines verkürzten Androgenrezeptors mit 77 Glutaminresten gleichfalls zu einem gesteigerten Anteil von Aggregat positiven Zellen

führt. Die strukturellen Eigenschaften der möglicherweise durch die verkürzte Rezeptorvariante gebildeten Aggregate sollten mit den durch den vollständigen Rezeptor gebildeten Strukturen verglichen werden. Für dieses Experiment wurden cDNA Konstrukte des AR mit unterschiedlich langer Glutaminsequenz (22 bzw. 77 Glutaminreste), die eine Deletion des C-Terminus ab Aminosäure 682 aufwiesen, in Cos-7 Zellen exprimiert. Nach der immunocytochemischen Färbung der Rezeptoren mit dem im N-terminalen Bereich bindenden polyklonalen anti-AR Antikörper zeigte sich, daß die deletierten Rezeptoren, unabhängig von der Länge der Glutaminsequenz, ausschließlich nukleär lokalisiert waren (Abb. 14). Die Expression war nicht mit der Bildung cytoplasmatischer Aggregate assoziiert. In den Kernen der transfizierten Zellen waren nach immunocytochemischer Färbung des AR keinerlei auffällige Strukturen zu beobachten, die auf die Bildung intranukleärer Aggregate hingewiesen hätten (Abb 11 vergleiche A und B). Da der C-Terminus des AR die Hormonbindedomäne repräsentiert, hatte die Behandlung der Zellen mit Hormon erwartungsgemäß keinerlei Einfluß auf die Lokalisierung der gebildeten Proteine (Abb. 14 A und B). Ein Rezeptor, dessen Kernlokalisierung konstitutiv und nicht mehr induzierbar war und der sich zum Zeitpunkt der Behandlung schon längere Zeit im Kern befand, zeigte keine Aggregatbildung. Die mit dem vollständigen AR beobachtete Aggregatbildung war eine transiente Erscheinung, bereits 16 h nach der Hormonbehandlung waren keine Aggregate mehr nachweisbar. Daher bestand die Möglichkeit, daß zu dem späten Zeitpunkt an dem die ARdHBDQ22 bzw. ARdHBDQ77 exprimierenden Zellen untersucht wurden (48 h nach der Transfektion), bereits keine, möglicherweise zuvor gebildeten, cytoplasmatischen Aggregate mehr vorhanden waren. Eine weitere Möglichkeit wäre aber auch, daß die konstitutive Lokalisierung des Rezeptors im Kern nicht zur Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten führte, somit also das Zytoplasma der Ort der Entstehung dieser Aggregate ist. Um zu überprüfen, ob die ausschließliche Lokalisierung des Hormon gebundenen Rezeptors im Zytoplasma ausreichend ist um Aggregate zu erzeugen, wurden Mutanten des Rezeptors, die in der Kernlokalisierung defekt sind, in Cos-7 Zellen exprimiert.

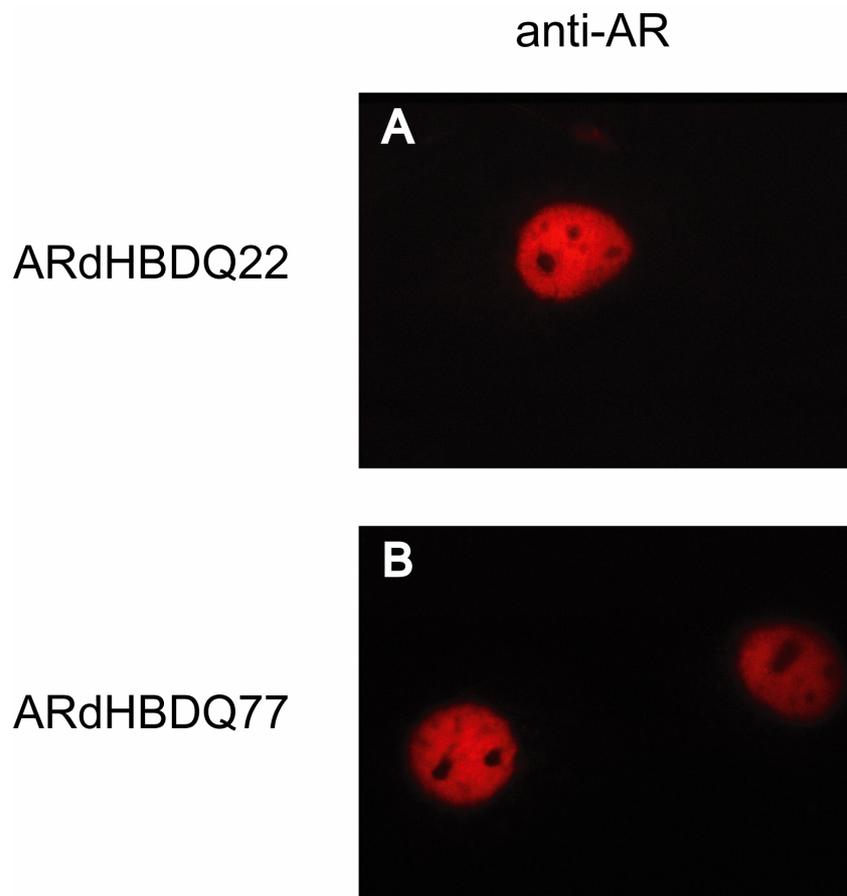


Abb. 14 Der Androgenrezeptor mit C-terminaler Deletion formt keine Aggregate. Glutaminsequenz unabhängige nukleäre Lokalisierung einer C-terminal verkürzten Mutante des AR. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und 24 h später mit je 1,5 μg der ARdHBDQ22- und ARdHBDQ77-Konstrukte transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit DHT (100 nM) für 3 h. Die Zellen wurden methanolfixiert und mit dem polyklonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axioskop Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung.

3.10 Bildung zytoplasmatischer Aggregate durch Mutanten des Androgenrezeptors, die in der Kerntranslokation defekt sind

Es besteht die Möglichkeit, daß der verlangsamte Transport des AR mit verlängerter Glutaminsequenzen in den Kern mit der Entstehung zytoplasmatischer Aggregate korreliert. Diese Idee leitet sich aus der Beobachtung ab, daß die meisten Aggregate während der nukleären Translokation des AR gebildet wurden (siehe Tabelle 2, vergleiche A und B). Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage, welche Konsequenz die vollständige Unterdrückung einer Hormon induzierten nukleären Translokation auf die Entstehung von Aggregaten und die subzelluläre Lokalisierung des Rezeptors hätte. Eine Möglichkeit die Hormon induzierte Translokation des Rezeptors in den Kern zu unterdrücken stellt die Deletion des Kernlokalisierungssignals (NLS) dar (Simental *et al.*, 1991, Jenster *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1994). Eine im Labor verfügbare NLS Deletionsmutante des AR (ARdNLSQ22) wurde in Cos-7 Zellen exprimiert und immunzytochemisch mit einem polyklonalen anti-AR Antikörper gefärbt. Ohne Hormongabe ist der ARdNLSQ22 gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Abb. 15 A). Auch im differentiellen Interferenzkontrast waren in diesen Zellen keine auffälligen Strukturen zu beobachten (Abb. 15 B).

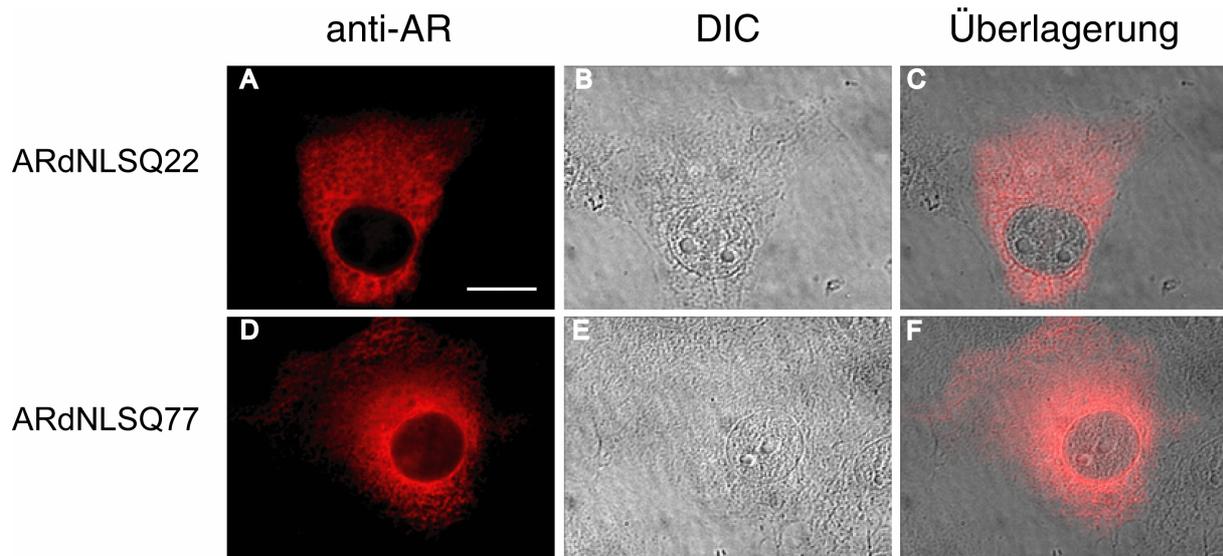


Abb. 15 Hormon freie Lokalisierung des ARdNLSQ22 bzw. ARdNLSQ77. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und 24 h nach der Transfektion mit je 1,5 μg der ARdNLSQ22 bzw. ARdNLSQ77 transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit Ethanol (0,08 % (v/v)) für 3 h. Die Zellen wurden fixiert und mit dem polyklonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Die transfizierten Konstrukte sind am linken Rand angegeben. (A) und (D) Immunfluoreszenzaufnahme des TRITC markierten AR. (B) und (E), differenzielle Interferenzkontrastaufnahme (DIC). (C) und (F) Überlagerung der für das jeweilige Konstrukt gemachten Fluoreszenz- und DIC- Aufnahme. Art der Aufnahme jeweils am oberen Rand angegeben. Der Balken entspricht einer Länge von 15 μm .

Nach Hormongabe erfolgte die Bildung ringförmiger, seltener aber auch beerenförmiger (im Bild nicht zu sehen) zytoplasmatischer Strukturen (Abb. 16 A - C). Die ringförmige immunzytochemische Färbung der Aggregate könnte darauf zurückzuführen sein, daß das Zentrum dieser Strukturen für den AR Antikörper schlecht zugänglich war. Die im differenziellen Interferenzkontrast (DIC) gut erkennbare dropsartige Form der Aggregate (Abb. 16 B) ließ ebenfalls auf einen zonalen Aufbau der Strukturen schließen. Da die Verlängerung der Glutaminsequenz alleine die Entstehung vergleichbarer Strukturen bewirkte wurde nun untersucht, welche Konsequenz die Verlängerung der Glutaminsequenz im NLS deletierten Rezeptor für die Ausprägung der Aggregate hatte. Ein c-DNA-Konstrukt, das eine

Verlängerung der Glutaminsequenz auf 77 Glutaminreste und die Deletion des NLS aufwies (ARdNLSQ77), wurde ebenfalls in Cos-7 Zellen exprimiert. Der ARdNLSQ77 zeigte die gleiche Hormon unabhängige Verteilung wie ARdNLSQ22 (Abb. 15 D - F). Nach Hormongabe war im Unterschied zu ARdNLSQ22 wesentlich häufiger die Bildung beerenförmiger Strukturen zu beobachten (Abb. 16 D - F). Darüber hinaus führte die Amplifikation der Glutaminsequenz in der NLS-Mutante zu der Hormon abhängigen Bildung von nadel- bis stabförmiger zytoplasmatischer Strukturen in ca. 10 % der transfizierten Zellen. Diese Strukturen wurden spezifisch nur von dieser Rezeptorvariante gebildet (Abb. 16 G - I). Die nadelförmigen Gebilde erreichten eine Länge von ungefähr 6 μm . Sie wiesen häufig eine blütenähnliche Organisation auf. Meist waren sie epinukleär lokalisiert. Die NLS- Mutanten translozierten nach 1,5, 3 oder 16 h nicht in den Kern. Auch nach 16 h war in allen Zellen Aggregate zu finden. Sie waren allerdings kleiner als die nach 3 h zu beobachtenden Strukturen. Nadelförmige Strukturen waren nach diesem Zeitraum nicht mehr zu finden.

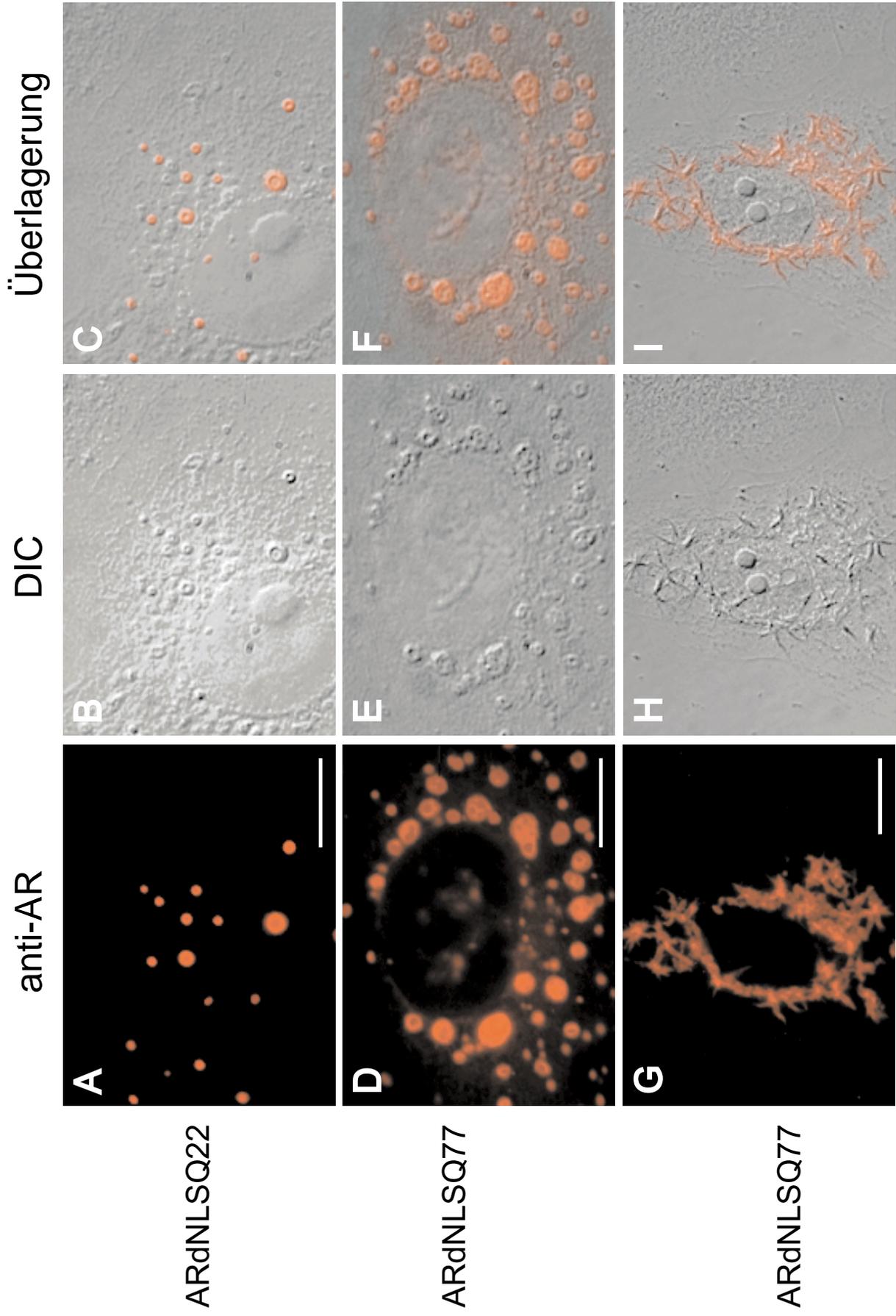


Abb.16 Eine kerntranslokationsdefekte Mutante des AR bildet Hormon abhängig zytoplasmatische Aggregate. Die Verlängerung der Glutaminsequenz in dieser Mutante führt zur Bildung spezifischer Strukturen. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und 24 h nach der Transfektion mit je 1,5 μ g der ARdNLSQ22 bzw. ARdNLSQ77 transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit DHT (100nM) für 3 h. Die Zellen wurden fixiert und mit dem polyklonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper. Die Beobachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Die transfizierten Konstrukte sind am linken Rand angegeben. (A), (D) und (G) Immunfluoreszenzaufnahme des TRITC markierten AR. (B), (E) und (H) differenzielle Interferenzkontrastaufnahme (DIC). (C), (F) und (I) Überlagerung der für das jeweilige Konstrukt gemachten Fluoreszenz und DIC Aufnahme. Art der Aufnahme ist jeweils am oberen Rand angegeben. Die jeweils transfizierten Konstrukte sind am linken Rand der Abbildung angegeben. Der Balken entspricht bei A und D einer Länge von 30 μ m und bei G 15 μ m.

Die Entstehung der beschriebenen Strukturen ist möglicherweise ein energieabhängiger Prozeß. Aus diesem Grund wurde die Lokalisierung der Mitochondrien, den zellulären Energiequellen, in Bezug auf die Aggregate untersucht. Eine immunzytochemische Färbung der Mitochondrien von ARdNLSQ77 transfizierten Cos-7 Zellen mit einem gegen das mitochondriale Enzym Cytochrom Oxygenase (Cox) gerichteten Antikörper wurde durchgeführt. Eine immunzytochemische Färbung des AR wurde in diesem Versuch nicht vorgenommen. Abb. 17 A und C zeigt die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung der Mitochondrien in einer Zelle, bei der im differenziellen Interferenzkontrast keine zytoplasmatischen Aggregate erkennbar waren (Abb. 17 B). Abb. 17 D-F zeigt, daß Mitochondrien sich bevorzugt um runde und beerenförmige Aggregate gruppierten. Mitochondrien ließen sich an den Rändern der Aggregate, nicht aber in den Aggregaten selbst nachweisen. Bevorzugt gruppierten sich die Organellen um besonders große Aggregate, die sich in der Nähe des Nukleus anreicherten. Einzelne kleinere im Zytoplasma lokalisierte Strukturen zeigten häufig keine Kolo-kalisierung mit Mitochondrien (Abb 17 F, Pfeil). Dies konnte vergleichbar auch für die von ARQ77 und ARdNLSQ22 gebildeten Aggregate beobachtet werden (nicht gezeigt). Die subzelluläre Verteilung der Mitochondrien änderte sich ebenfalls bei der Anwesenheit von nadelförmigen Strukturen (Abb. 17 vergleiche I mit C). Die bisher beobachteten gleichmäßig über das Zytoplasma verteilten Mitochondrien waren nun hauptsächlich epinukleär lokalisiert.

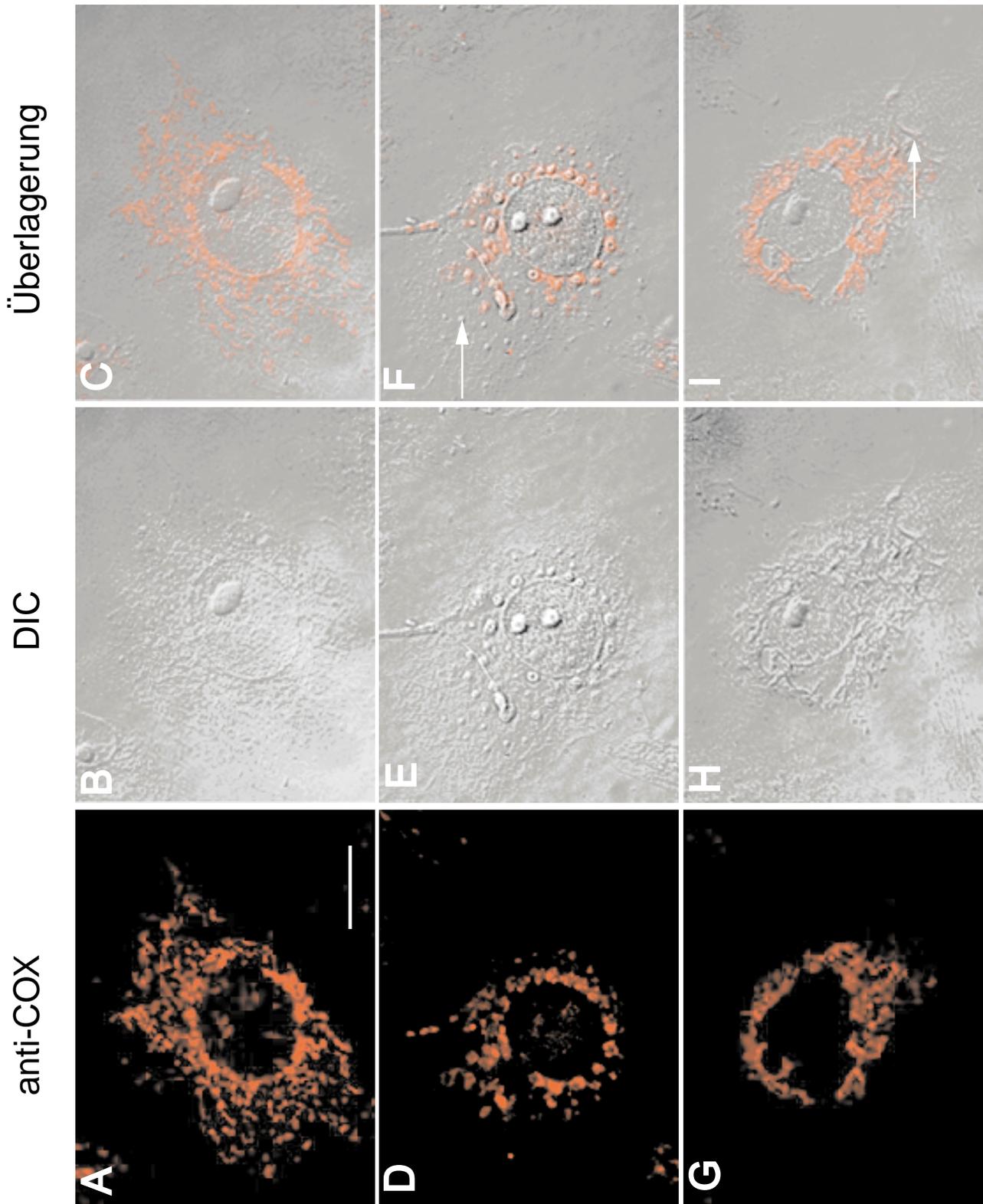


Abb. 17 Mitochondrien lagern sich um die durch den ARdNLSQ77 gebildeten Strukturen an. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und 24 h nach der Transfektion mit $1,5 \mu\text{g}$ des ARdNLSQ77-Konstruktes transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit DHT (100nM) für 3 h. Die Zellen wurden fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper gegen Cytochrom Oxygenase (COX) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Maus Antikörper. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Der Balken entspricht einer Länge von $15 \mu\text{m}$. **(A)**, **(D)** und **(G)** Immunfluoreszenzaufnahme der TRITC markierten Cytochrom Oxygenase. **(B)**, **(E)** und **(H)** differenzielle Interferenzkontrastaufnahme (DIC). **(C)**, **(F)** und **(I)** Überlagerung der für das jeweilige Konstrukt gemachten Fluoreszenz und DIC Aufnahme. Die Art der Aufnahme ist jeweils am oberen Rand angegeben.

Die individuell erkennbaren länglichen Organellen gingen in eine kompakte Struktur über. Deutlich ist zu erkennen, daß die nadelförmigen Strukturen gehäuft in der Kerngegend auftraten (Abb.13 H,) einzelne Strukturen befanden sich jedoch auch in weiterer Entfernung vom Kern (Abb. 17 I, Pfeil). In diesem Bereich war keine übereinstimmende Lokalisierung von nadelförmigen Strukturen und Mitochondrien zu erkennen (Abb. 17 I). Die bevorzugte Kolo-kalisierung der Mitochondrien mit großen Aggregaten läßt möglicherweise auf einen erhöhten Energiebedarf dieser Strukturen schließen.

3.11 Der Einfluß von Antihormonen auf die Bildung zytoplasmatischer Strukturen

Eine besondere Beteiligung der Hormonbindedomäne an der Formierung der Aggregate folgt aus ihrer strikt Hormon abhängigen Formierung. Ebenso waren keine zytoplasmatischen Aggregate nach der Expression der Rezeptoren, bei denen die Hormonbindedomäne deletiert war, zu beobachten. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des gesamten Moleküls. Im inaktiven Zustand liegt der AR im Zytoplasma mit unterschiedlichen Hitzeschockproteinen (Hsps) assoziiert in einem hochmolekularen Komplex vor. Dieser Komplex setzt sich aus Hsp90, Hsp70, Hsp56 ebenso p23 und DnaJ zusammen (Veldscholte *et al.*, 1992, Caplan *et al.*, 1995, zur Übersicht Bohlen *et al.*, 1995). Die Hormon induzierte Konformationsänderung hat die nachfolgende Dissoziierung des Proteinkomplexes und die Translokation des Rezeptors in den Kern zur Folge. Kuli *et al.*, (1995) definierten durch proteolytische Analyse nach Hormonbindung zwei initiale Phasen der Konformationsänderung. In der initialen Phase erfolgt danach eine erste Konformationsänderung des Rezeptors gleich nach der Bindung eines Agonisten. Die Dissoziation des hochmolekularen Komplexes erfolgt nach diesem Modell während der zweiten Phase. Antihormone, die in der gleichen Region wie das Hormon binden, blockieren entweder komplett oder teilweise die zweite Phase (Kuil *et al.*, 1995) indem sie eine „falsche“ Konformationsänderung bewirken. Man unterscheidet steroidische und nicht steroidische Antihormone. Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Komposition bewirken sie möglicherweise unterschiedliche Konformationsänderungen des Rezeptors. Es wurde untersucht, welchen Einfluß die durch Antihormone induzierte Konformationsänderung auf die Entstehung der zytoplasmatischen Aggregate hatte. Dabei wurden sowohl steroidische als auch nicht steroidische Antihormone verwendet.

3.11.1 Der Einfluß des steroidischen Antihormons Cyproteronacetat (CPA) auf die nukleäre Translokation und die Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten

In Cos-7 Zellen wurden ARQ22 und ARQ77 transient exprimiert. Nach Behandlung der Zellen mit CPA erfolgte die immunzytochemische Markierung des AR mit einem polyklonalen anti-AR Antikörper und die optische Analyse der Zellen unter dem Mikroskop. CPA bewirkte nach 3 h eine vollständige nukleäre Translokation beider Rezeptorvarianten (Abb. 18 A und B). Nach der CPA-Behandlung war keine Aggregatbildung in ARQ22 oder ARQ77 exprimierenden Zellen zu beobachten (Abb. 18 A und B). Um den Effekt von CPA auf die Formierung von Aggregaten durch die NLS-Mutanten des AR zu studieren, wurde der ARdNLSQ77 in COS-7 Zellen exprimiert. Die Behandlung der Zellen mit CPA in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-6} und 10^{-7} M) führte zur Bildung von kleinen punktförmigen Aggregaten (Abb. 18 E und F). Die Bildung nadelförmiger Strukturen war in diesen Zellen ebenfalls mit keiner der angewandten Konzentrationen zu beobachten (Abb. 18 E und F). Eine DHT Konzentration von 10^{-8} M war ausreichend, um die Formierung von Aggregaten bei ARdNLSQ77 exprimierenden Zellen hervorzurufen (Abb. 18 C und D). Diese Konzentration war ebenfalls ausreichend, um mit allen anderen AR-Varianten die beschriebenen Strukturen zu erzeugen (vergleiche hierzu auch Abb. 13). In einem Kompetitonsexperiment wurde überprüft, ob die durch DHT erzeugten Strukturen durch gleichzeitige Zugabe von CPA beeinflusst werden konnte. Bei den beiden eingesetzten CPA-Konzentrationen entstanden bei gleichzeitiger Behandlung von ARdNLSQ77 exprimierenden Zellen mit 10^{-8} M DHT nur kleine Aggregate in großer Zahl. Die Bildung von großen beerenförmigen Strukturen konnte nicht beobachtet werden. Ebenso wurde die Bildung von nadelförmiger Strukturen durch ARdNLSQ77 vollständig unterdrückt (Abb. 18 G und H).

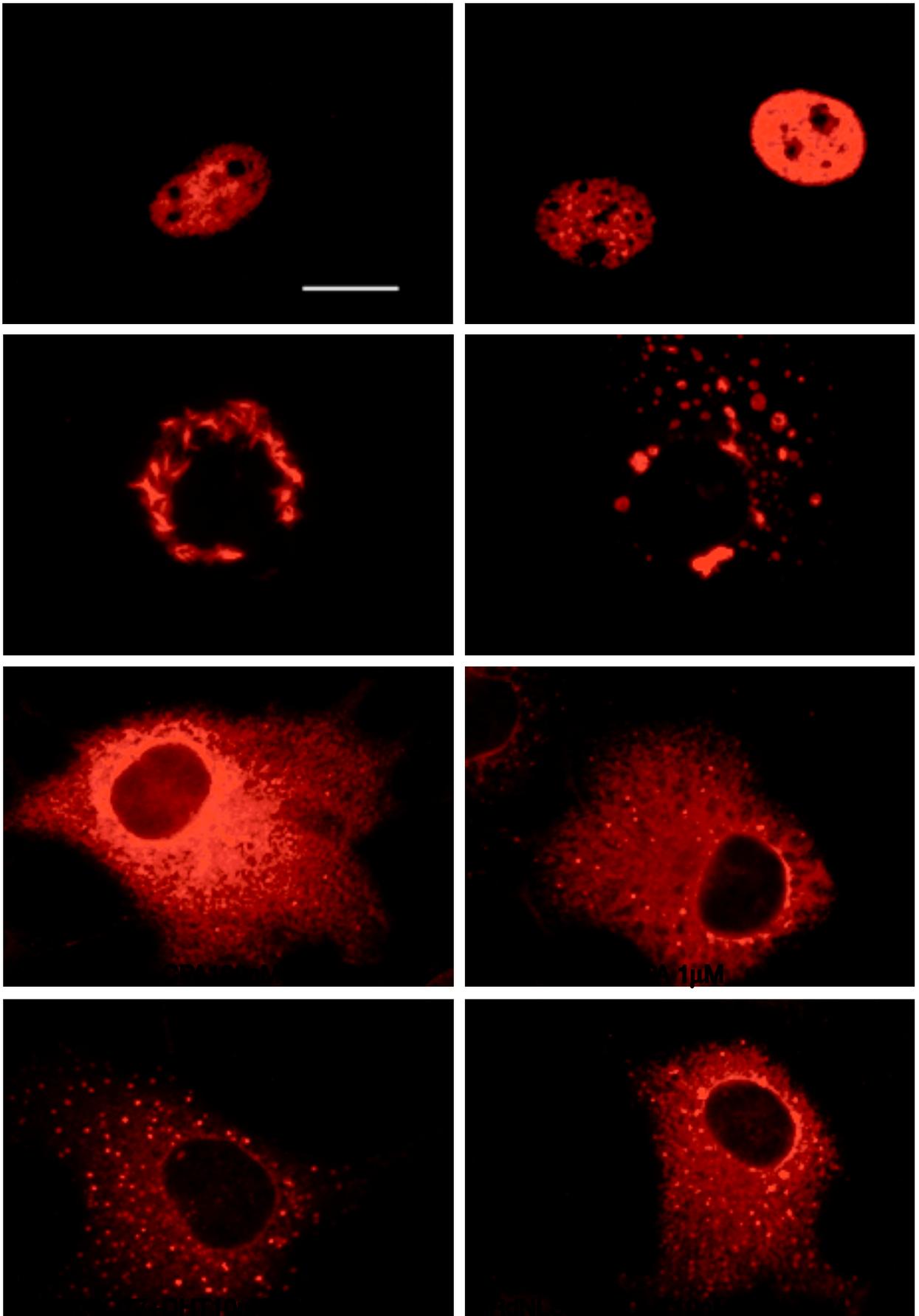


Abb. 18 Einfluß des steroidischen Antihormones CPA auf die Bildung zytoplasmatischer Aggregate. Inhibierung der durch DHT induzierten Aggregate. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und nach 24 h mit je 1,5 µg der ARdNLSQ77-, ARWT- bzw. ARQ77- Konstrukte transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den in den einzelnen Bildern angegebenen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen für jeweils 3 h. Die Zellen wurden fixiert und mit dem polyclonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Das jeweils transfizierte Konstrukt ist in jedem Bild angegeben. Der Balken entspricht einer Länge von 15 µm.

3.11.2 Der Einfluß von nicht steroidischen Antiandrogenen auf die nukleäre Translokation und Aggregatbildung

Auch bei diesem Experiment wurden zunächst ARQ22 (Abb. 16 A und B) und ARQ77 (Abb. 19 C und D) in COS-7 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit Casodex bzw. Hydroxyflutamid behandelt, immunzytochemisch mit einem anti- AR Antikörper angefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Unabhängig von der Länge der Glutaminsequenz des transfizierten Rezeptors führten weder Casodex noch Hydroxyflutamid zu einer ausgeprägten Kerntranslokation. Abb. 19 A und B zeigt beispielhaft die Translokation des ARQ22, nach 3 h Behandlung der Zellen mit Casodex (Abb. 19 A) bzw. Hydroxyflutamid (Abb. 19 B). Abb. 19 C und D zeigt das Ergebnis der Casodex- bzw. Hydroxyflutamidbehandlung der mit ARQ77 transfizierten Zellen. Auch hier war nach 3 h Behandlung keine vollständige Translokation des ARQ77 zu beobachten. Die Behandlung von ARQ22 bzw. ARQ77 exprimierenden Zellen führte nicht zur Bildung zytoplasmatischer Aggregate.

Die Behandlung von ARdNLSQ77 transfizierten Zellen mit Casodex bzw. Hydroxyflutamid führte nicht wie die Behandlung mit CPA zu der Bildung kleiner Aggregate. Die subzelluläre Verteilung des Rezeptors blieb gegenüber unbehandelten Zellen vollkommen unverändert (Abb. 19 E und F).

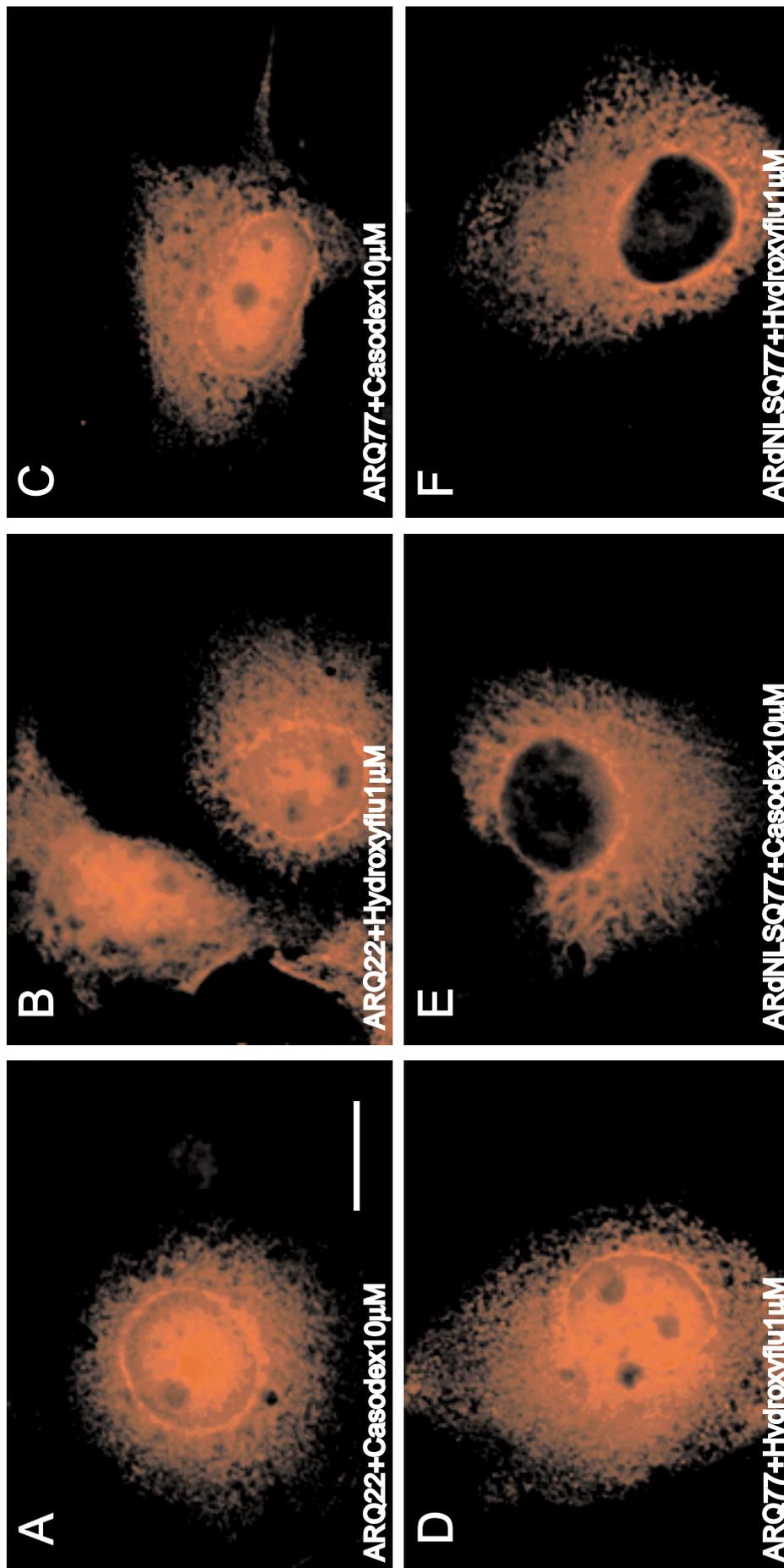


Abb. 19 Hydroxyflutamid- bzw. Casodexbehandlung führt nicht zu der Bildung zytoplasmatischer Aggregate durch den ARQ22, ARQ77 bzw. ARdNLSQ77. Je 5×10^4 Cos-7 Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS) kultiviert und nach 24 h mit je 1,5 μg der ARdNLSQ77-, ARWT- bzw. ARQ77 Konstrukte transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in DMEM (ohne Phenolrot, 3 % CCS) für weitere 24 h gehungert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den in den einzelnen Bildern angegebenen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen für jeweils 3 h. Die Zellen wurden fixiert und mit dem polyclonalen anti-AR 44 Antikörper inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem TRITC markierten anti-Kaninchen Antikörper. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop. Das jeweils transfizierte Konstrukt ist in jedem Bild angegeben. Der Balken entspricht einer Länge von 15 μm .

Die durch die Antiandrogene vermittelte Konformation des Rezeptors ist also nicht nur unfähig Transaktivierung zu vermitteln, sondern reicht auch für die Aggregatbildung nicht aus. Eine bestimmte Konformation der HBD ist also für die Aggregatbildung erforderlich. Diese Konformation ist wahrscheinlich mit der, die Transaktivierungsfunktion des Rezeptors vermittelnden Struktur identisch. Insgesamt weist dies auf eine herausragende Bedeutung der HBD bei der Bildung der Aggregate hin.

Zusammengefaßt zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, daß eine strukturelle Änderung in Folge der Verlängerung der N-terminalen Glutaminsequenz des AR zu einer verminderten Interaktion mit Tubulin führte. Die Spezifität dieser Interaktion wurde für den gesamten Rezeptor mit nicht pathogener Sequenzlänge in einem Kosedimentationsexperiment bestätigt. Die subzelluläre Lokalisierung des Rezeptors in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminsequenz und dem Vorhandensein von Mikrotubuli wurde untersucht. Die Zerstörung der Mikrotubuli hatte keinen Einfluß auf die Hormon abhängige Translokation des Rezeptors vom Zytoplasma in den Kern. Ein Einfluß auf die Hormon unabhängige Lokalisierung des Rezeptors war jedoch insbesondere für einen Rezeptor mit nur einem Glutaminrest an Stelle der Glutaminhomopolymerfolge zu beobachten. In weiteren Studien wurde die Bildung Hormon abhängiger Aggregate beobachtet. Die Hormon induzierte Aggregatbildung wurde durch das Zurückhalten des Rezeptors im Zytoplasma durch die Zerstörung seines Kernlokalisierungssignals verstärkt. Dies stellt einen Hinweis auf die wesentliche Beteiligung zytoplasmatischer Faktoren an der Bildung dieser Aggregate dar. Auch der Ligand erwies sich

in diesem Zusammenhang als wichtig, da die Hormonantagonisten, die eine weniger effiziente Kerntranslokation des Rezeptors bewirken, nicht zu der Bildung von Aggregaten führte.

4 Diskussion

In der hier vorgestellten Arbeit wurden unterschiedliche Studien durchgeführt, um die Konsequenzen der Amplifikation der Polyglutaminsequenz im Androgenrezeptor (AR) zu klären. Eine solche Verlängerung der Glutaminsequenz ist die Ursache für die spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA). Der dabei auftretende zelltypspezifische Phänotyp könnte auf einer strukturellen Veränderung des Androgenrezeptors beruhen.

4.1 Die erhöhte Affinität des 1c2 Antikörpers zu dem glutaminsequenzamplifizierten Androgenrezeptor als ein Indiz für geänderte strukturelle Eigenschaften

In Abschnitt 3.1 dieser Arbeit wurde gezeigt, daß ein Antikörper, der spezifisch mit verlängerten Glutaminsequenzen interagiert (1c2 Antikörper; Trottier *et al.*, 1995), den AR in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge erkannte. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten, die einen längenabhängigen Affinitätszuwachs dieses Antikörpers zu Proteinen mit amplifizierter Glutaminsequenz beschreiben (Huntingtin, Ataxin-1, Trottier *et al.*, 1995). Das Bindungsverhalten des Antikörpers ist also unabhängig von benachbarten Aminosäuresequenzen. Die starke Abhängigkeit der Interaktion von der Länge der Sequenz spricht dafür, daß der Antikörper eine bestimmte Konformation mit hoher Affinität erkennt. Für den deutlichen Anstieg der Bindungsaktivität des Antikörpers wurde eine teilweise bivalente Bindung an die Glutaminsequenz diskutiert (Trottier *et al.*, 1995). Die Tatsache, daß der 1c2 Antikörper im *Westernblot*, also unter denaturierenden Bedingungen, spezifisch die lange Glutaminsequenz erkannte, spricht für eine große Stabilität der erkannten Struktur. Diese stabile Struktur könnte somit zu einer veränderten Interaktion des betroffenen Proteins mit weiteren Faktoren führen. Die Identifikation solcher Faktoren sollte Einblicke in die Entstehung eines pathogenen Phänotyps ermöglichen.

4.2 Interaktion der Glutaminsequenzsonden mit Tubulin

Die strukturelle Veränderung infolge der Glutaminsequenzamplifikation kann zum Verlust oder aber zum Gewinn einer Proteininteraktion führen. Tatsächlich wurden bereits Proteine identifiziert, die nur im Bereich einer verlängerten Glutaminsequenz binden. So wurde z.B. HAP-1 als spezifisch mit der verlängerten Glutaminsequenz des Huntingtin interagierendes Protein identifiziert (Li *et al.*, 1995). Der Importfaktor Ran hingegen wurde als spezifisch mit der Glutaminhomopolymerfolge des Androgenrezeptors interagierender Faktor beschrieben. Die Verlängerung der Glutaminsequenz auf eine pathogene Sequenzlänge von 49 Glutaminresten führte zu dem Verlust der Bindungsaktivität von Ran (Hsiao *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis wurde in einem Hefe Zweihybrid System unter der Verwendung einer humanen cDNA-Bank erzielt. In dieser Arbeit wurde eine chromatographische Aufreinigung von Mausgehirnextrakten verwendet um mit der Glutaminsequenz interagierende Faktoren zu identifizieren. Die hierbei verwendeten Sonden bestanden aus einem Fragment des Androgenrezeptors mit nicht pathogener (22 Glutaminreste; Q22) oder pathogener (45 Glutaminreste; Q45) Sequenzlänge. Die Q45-Sonde war zuvor durch den 1c2 Antikörper mit weit höherer Affinität erkannt worden als die Q22-Sonde. Dies deutete auf eine konformationelle Änderung in der Q45-Sonde hin, die der Strukturveränderung im Androgenrezeptor mit verlängerter Glutaminsequenz entsprach.

Die chromatographische Aufreinigung und Sequenzanalyse eines mit Q22 aber nicht mit Q45 interagierenden Proteins ergab, daß es sich dabei um einen Bestandteil des Zytoskletts, nämlich Tubulin handelte. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ran und Tubulin ergab, trotz gleichem Interaktionsverhalten zu den verschiedenen Glutaminhomopolymerfolgen, keine Homologie. Da beide Proteine GTP bindende Faktoren sind, weisen sie jedoch strukturelle Ähnlichkeiten bezüglich der Nukleotidbindedomäne auf. Bei Ran und Tubulin setzt sich dieses Motiv aus sechs β -Faltblättern und zwei α -Helices zusammen (Kull und Fletterick, 1998). Solch eine Nukleotidbindedomäne findet sich auch in der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche spezifisch mit Glutaminsequenzen interagiert (Erickson, 1998). Im Gegensatz zu Tubulin und Ran band GAPDH spezifisch an ein synthetisches, aus 60 Glutaminresten bestehendes Peptid, nicht jedoch an eine kurze synthetische, aus 20

Glutaminresten zusammengesetzte, Sequenz. GAPDH interagiert aber mit Huntingtin, dem DRPLA Genprodukt Atrophin, Ataxin-1 und dem Androgenrezeptor, die alle normale Glutaminsequenzlängen aufwiesen (Burke *et al.*, 1996; Koshy *et al.*, 1996). Die Proteinbereiche von GAPDH, Tubulin und Ran, die an die Glutaminsequenz binden wurden bisher noch nicht identifiziert. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß das in allen drei genannten Proteinen vorhandene Nukleotidbindemotiv zu der Interaktion mit Glutaminsequenzen beiträgt. Weitere biochemische Studien sind daher notwendig, um die genaue Interaktionsstelle zwischen Tubulin und der Glutaminsequenz nachzuweisen.

Ran erfüllt eine wichtige Rolle beim nukleären Transport von Proteinen (Görlich *et al.*, 1996). Auch die Mikrotubuli sind möglicherweise am Protein-Transport oder an der zytoplasmatischen Lokalisierung von Faktoren wie z.B. des Transkriptionsfaktors NFκB beteiligt (zur Übersicht Gundersen und Cook, 1999). Es war also interessant zu klären, ob der AR mit Mikrotubuli interagiert. Dies wurde in einem Kosedimentationsexperiment überprüft. Hierbei konnte tatsächlich die Interaktion des AR mit Mikrotubuli nachgewiesen werden. Der Vergleich des Kosedimentationsverhaltens zeigte, daß der Rezeptor mit der nicht pathogenen Sequenzlänge (ARQ22) eine deutlich höhere Affinität zu Mikrotubuli aufwies als ein Rezeptor mit einer stark verlängerten Glutaminsequenz (ARQ77). Mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR) und dem Vitamin D₃ Rezeptor (VDR) durchgeführte Studien ergaben ebenfalls eine Interaktion mit Mikrotubuli (Akner *et al.*, 1990, Barsony *et al.*, 1992, zur Übersicht Akner *et al.*, 1995). Da von diesen beiden genannten Rezeptoren nur der GR eine N-terminale Glutaminsequenz besitzt, ist es unwahrscheinlich, daß das Glutaminpeptid im Androgenrezeptor die tatsächliche Interaktionsdomäne darstellt. Möglicherweise erfüllt sie aber eine modulierende Funktion, wobei eine relativ kurze Sequenz eine Interaktion des AR mit Mikrotubuli erlaubt, eine längere Glutaminsequenz aufgrund der Konformationsänderung diese Interaktion jedoch stört.

In der von Barsony *et al.*, (1992) bezüglich des VDR durchgeführten zytologischen Studie wurde gezeigt, daß die durch Nocodazol induzierte Zerstörung von Mikrotubuli eine Inhibierung der Hormon abhängigen nukleären Translokation des Rezeptors und eine Veränderung der Hormon unabhängigen Verteilung des VDR im Zytoplasma bewirkte. Im

Gegensatz dazu hatte die Zerstörung der Mikrotubuli keinen Einfluß auf die Hormon abhängige nukleäre Translokation des GR (Czar *et al.*, 1995). Das Fehlen eines Mikrotubuliskeletts führte jedoch in Abwesenheit von Hormon, wie beim VDR, zu einer veränderten Verteilung des zytoplasmatischen GR hin zur Zellperipherie (Akner *et al.*, 1990). Entsprechende Ergebnisse wurden in der vorliegenden Studie auch für den AR erzielt. Wie im Falle des GR hatte die durch Nocodazol hervorgerufene Zerstörung der Mikrotubuli keinen Effekt auf die Hormon induzierte Kerntranslokation des AR. Dies galt für alle verwendeten AR-Varianten (ARQ1, ARQ22 und ARQ77). Diese Ergebnisse in Kombination mit den für den GR und den VDR publizierten Daten sprechen gegen ein Modell, in dem die Assoziation von Mikrotubuli mit Steroidrezeptoren direkt über die Glutaminsequenz vermittelt wird und so an der Hormon abhängigen nukleären Translokation beteiligt ist.

Einen eindeutigen Einfluß der Nocodazolbehandlung auf die Hormon freie subzelluläre Lokalisierung konnte nur für die AR Mutante ARQ1, die nur einen Glutaminrest an der Position der Glutaminsequenz besaß, beobachtet werden. ARQ1 lokalisierte im Gegensatz zu ARQ22 und ARQ77 im Kontrollansatz (ohne Hormon und Nocodazol) zu einem großen Teil nukleär. Offensichtlich hat also die Glutaminsequenzlänge einen Einfluß auf die Hormon freie Verteilung des Rezeptors. Die Zerstörung der Mikrotubuli in Abwesenheit des Liganden resultierte in einer verstärkten zytoplasmatischen Verteilung des ARQ1. ARQ22 und ARQ77 jedoch zeigten ohne Mikrotubuli keine deutliche Veränderung ihrer zytoplasmatischen Lokalisierung. Der Hormon freie Transport des ARQ1 in den Kern ist also Mikrotubuli abhängig. Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse auf die Existenz eines Hormon abhängigen und eines Hormon unabhängigen nukleärer Transportweges für den AR hin. Der Mikrotubuli abhängige und Liganden freie Transport des AR wird von der Länge der Glutaminsequenz moduliert.

Weiterhin folgt aus den vorgelegten Daten, daß die Interaktion des AR mit Mikrotubuli über eine andere, von der Glutaminsequenz verschiedenen Domäne im AR vermittelt wird. Da Tubulin ein in allen Zellen exprimiertes Protein ist, kann die Interaktion des AR und der Verlust der Interaktion nach Verlängerung der Glutaminsequenz alleine auch nicht den Phänotyp erklären, der spezifisch nur in bestimmten neuronalen Zellpopulationen auftritt. Aufgrund der Tatsache, daß die Hormon freie Situation in Patienten so nicht vorzufinden ist,

können die im Verlauf dieser Studie beobachteten Unterschiede in der Lokalisierung des Rezeptors unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht zu der Aufklärung der Pathogenität beitragen. Dennoch stellen diese Ergebnisse einen wichtigen Befund bezüglich des Transportes des normalen Androgenrezeptors dar.

4.3 Hormon abhängige Translokationsgeschwindigkeit des Androgenrezeptors mit unterschiedlich langer Glutaminsequenz

Unabhängig von der Assoziation mit Mikrotubuli wurde ein Effekt der Glutaminsequenzlänge auf die Hormon abhängige nukleäre Translokation des AR festgestellt. Es zeigte sich, daß die Hormon abhängige Translokationsgeschwindigkeit invers mit der Länge der Glutaminsequenz korrelierte. Im Vergleich zu ARQ1 und ARQ22 translozierte der ARQ77 nach Hormongabe deutlich langsamer in den Kern. Da die Interaktion des Rezeptors mit Mikrotubuli nicht für diesen Effekt verantwortlich sein kann, müssen andere Faktoren für den verlangsamten Transport verantwortlich sein. Naheliegend wäre die Beteiligung von Proteinen des nukleären Transportweges. Solche Faktoren vermitteln ihre Wirkung über sogenannte Kerntranslokationssequenzen (NLS).

Der Androgenrezeptor besitzt angrenzend an seine DNA-Bindedomäne eine Kernlokalisierungssequenz, die Homologie mit der des Nucleoplasmins aufweist (Robbins *et al.*, 1991). Proteine, die Kernlokalisierungssignale besitzen, assoziieren mit einem als α -Importin bezeichneten Faktor (Görlich *et al.*, 1994, Moroianu und Blobel, 1995). Das α -Importin interagiert seinerseits mit β -Importin (Adam und Adam, 1994; Radu *et al.*, 1995). Zusammen vermitteln diese beiden Importfaktoren das Ankoppeln des translozierenden Proteins an die Kernpore (Görlich *et al.*, 1995). In seinem GTP gebundenen Zustand bindet Ran im Kern an β -Importin und bewirkt die Freisetzung des transportierten Proteins von dem α - und β -Importin-Komplex im Kern (Adam, 1999). Der von Hsiao *et al.*, (1999) beschriebene Verlust der Bindungsaktivität von Ran an den AR mit verlängerter Glutaminhomopolymerfolge könnte also in Zusammenhang mit der verlangsamten Aufnahme

des Rezeptors in den Kern stehen. Dabei ist jedoch nicht klar, ob eine direkte Bindung von Ran an das zu importierende Protein erfolgt, oder die „Importmaschinerie“ nur über die Bindung von Ran an β -Importin arbeitet. In unserem Labor durchgeführte Vorversuche ergaben eine, im Vergleich zu ARQ22, verminderte Bindeaktivität von α - und β -Importin an den ARQ77. Weitere Studien wie z.B. ein *in vitro* Importassay müssen bezüglich des verlangsamten Imports weitergehende Aufklärung bringen.

4.4 Bildung unterschiedlicher zytoplasmatischer Aggregate durch den Androgenrezeptor

Im Zuge der Kerntranslokationsstudien wurden unterschiedliche Formen zytoplasmatischer Aggregate beobachtet, die durch den AR gebildet wurden. Neben spezifischer Aggregatbildung, die abhängig vom Hormonstatus und der Länge der Glutaminsequenz des transfizierten AR erfolgte (siehe unten), konnten immer in einer konstanten Anzahl von transfizierten Zellen auch unspezifische Strukturen beobachtet werden. Diese unspezifischen Strukturen weisen aufgrund ihrer äußeren Erscheinung und ihrer epinukleärer Lokalisierung Ähnlichkeit mit sogenannten Aggresomen auf (Johnston *et al.*, 1998). Aggresomen entstehen in Folge von starker Überexpression eines Proteins als perinukleäre Struktur. Das überexprimierte Protein lokalisiert dabei vollständig in den Aggresomen. Johnston *et al.*, (1998) folgerten, daß die Formierung solcher Strukturen eine generelle Reaktion von Zellen auf die Überschreitung der Kapazität des Proteasomenkomplexes darstellte. Möglicherweise kam es in den Zellen, in denen der AR besonders hoch exprimiert war, zur Bildung Aggresomen ähnlicher Strukturen.

Im Gegensatz zu diesen unspezifischen Strukturen wurde aber auch die strikt Hormon abhängige Formierung von AR enthaltenden Aggregaten beobachtet. Die Größe und Struktur dieser Aggregate variierte in Abhängigkeit von der Länge der Glutaminsequenz. Beispielsweise bildete der ARQ77 häufig große beerenförmige Strukturen, während der ARQ22 und der ARQ1 nur kleine punktförmige Aggregate bildete. Möglicherweise drückt sich in dem strukturellen Unterschied eine veränderte biochemische Zusammensetzung der Aggregate aus. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie wurde ebenfalls die Glutaminsequenzlängen abhängige Bildung zytoplasmatischer Aggregate durch den AR untersucht (Stenoiien *et al.*,

1999). Die Autoren dieser Studie beschrieben aber keine Unterschiede in der Struktur der Aggregate, die durch Glutaminsequenzvarianten des AR gebildet wurden. Jedoch wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Unterschied in der Häufigkeit der Aggregat bildenden Zellen in Abhängigkeit von der Glutaminsequenzlänge beschrieben. Dabei bildeten Zellen, die einen Androgenrezeptor mit einer Glutaminsequenzlänge von 48 Aminosäureresten exprimierten etwa doppelt so häufig Aggregate wie Zellen, die einen Androgenrezeptor mit einer Glutaminsequenzlänge von 22 Aminosäureresten exprimierten. Die in der vorliegenden Arbeit in Abschnitt 3.8 dargestellten Ergebnisse zeigen keinen deutlichen Unterschied in der Häufigkeit der Aggregatbildung beim Vergleich der ARQ22 und ARQ77 exprimierenden Zellen. In Zellen, die den ARQ1 exprimierten, war allerdings deutlich seltener die Formierung von Aggregaten zu finden. Eine weitere Differenz zwischen den von Stenoien *et al.*, (1999) beschriebenen und den hier vorgestellten Ergebnissen besteht in der Kinetik der Aggregatentstehung. Stenoien *et al.*, (1999) beobachteten eine maximale Anzahl der Aggregat positiven Zellen 16 h nach Hormongabe. Das Vorkommen, der in der hier präsentierten Studie beschriebenen Aggregate, war wesentlich transienter, da 16 h nach der Hormongabe keine Aggregate mehr nachweisbar waren. Bei ARQ1 exprimierenden Zellen waren sogar bereits 1,5 h nach der Hormoninduktion keine Aggregate mehr zu finden. Die Differenzen bezüglich Kinetik und Struktur sind möglicherweise auf die in den beiden Studien verwendeten unterschiedlichen Zellsysteme zurückzuführen. Beide Untersuchungen belegen jedoch ein verändertes Aggregationsverhalten des Androgenrezeptors mit verlängerter Glutaminsequenz. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, daß die Ausbildung der Aggregate strikt Hormon abhängig auftritt. Dies könnte erklären warum SBMA nur bei Männern auftritt, während Frauen höchstens milde Symptome der Krankheit zeigen (Ferlini *et al.*, 1995). Da der mutierte Rezeptor sowohl in Frauen als auch in Männern exprimiert wird, ist möglicherweise der deutlich niedrigere Testosteronspiegel in Frauen dafür verantwortlich, daß sie weitgehend symptomfrei bleiben.

Die Entstehung der spezifischen Aggregate des ARQ77 findet parallel zu seiner verlangsamten nukleären Translokation statt. Die Bildung Hormon abhängiger, zytoplasmatischer Aggregate ist auch für kerntranslokationsdefekte Androgenrezeptoren mit unterschiedlichen Aminosäuresubstitutionen und Deletionen im NLS beschrieben (Jenster *et al.*, 1993, Zhou *et*

al., 1994). Die Analyse von Rezeptoren mit einer Deletion des NLS in Kombination mit variierenden Glutaminsequenzlängen (ARdNLSQ22 bzw. ARdNLSQ77) erbrachte weiteren Aufschluß über die Konsequenz der zytoplasmatischen Lokalisierung des AR in Bezug auf die Bildung der Aggregate. Die kerntranslokationsdefekten Mutanten des Rezeptors bildeten in 100 % der transfizierten Zellen Aggregate. Die Verlängerung der Glutaminsequenz im ARdNLSQ77 führte jedoch im Vergleich zu ARdNLSQ22 nach Hormongabe zu einer gesteigerten Bildung beerenförmiger Strukturen. Die Expression des ARdNLSQ77 führte nach Hormonbehandlung zusätzlich zu der Bildung von zytoplasmatischen nadelförmigen Aggregaten. Diese Strukturen erinnern in ihrem Aussehen und in ihrer Größe an Aggregate wie sie von N-terminalen Fragmenten des Huntingtin *in vitro* gebildet wurden (Scherzinger *et al.*, 1997). Aufgrund ihrer Färbbarkeit mit dem Congorot Farbstoff wurden diese Strukturen von Scherzinger *et al.*, (1997) als Amyloid charakterisiert. Die durch den ARdNLSQ77 gebildeten Strukturen waren aber nicht durch Congorot anfärbbar (im Ergebnisteil nicht gezeigt). Diese Differenz deutet darauf hin, daß es sich bei den durch den ARdNLSQ77 gebildeten „Nadeln“ um grundlegend andere Strukturen handelt. Ob die nadelförmigen aus den beerenartigen Strukturen hervorgehen bleibt zu klären.

Die Experimente mit den NLS Mutanten zeigen, daß die zytoplasmatische Lokalisierung des Hormon beladenen AR eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung von Aggregaten darstellt. Form und Größe der Aggregate hängt dabei von der Länge der Glutaminsequenz ab. Daraus folgt, daß wahrscheinlich die vergleichsweise längere zytoplasmatische Verweildauer des ARQ77 bei Anwesenheit von Hormon (siehe oben) die Ausbildung der spezifischen Strukturen ermöglicht. Dies geschieht unter Umständen über die Interaktion mit weiteren zytoplasmatischen Faktoren.

Die Bildung von Aggregaten ist im Zusammenhang mit Glutaminamplifikationskrankheiten ein oft beschriebenes Phänomen. In Abhängigkeit von dem gewählten System wurden dabei Unterschiede in der Struktur und Lokalisierung der Aggregate beschrieben. Dabei konnte in verschiedenen Zellsystemen ein toxischer Effekt von polyglutaminenthaltenden Proteinfragmenten nachgewiesen werden (Merry *et al.*, 1998, Martindale *et al.*, 1998). Wie allerdings Aggregate, die aus Proteinen mit verlängerter Glutaminsequenz bestehen zu der pathogenität beitragen ist gänzlich ungeklärt. Die beobachtete Kolo-kalisierung von AR

enthaltenden Aggregaten mit Mitochondrien könnte in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. Dabei ist diese Beobachtung unter zwei Gesichtspunkten zu sehen. Zunächst erfordert die Formierung und Aufrechterhaltung der großen zytoplasmatischen Strukturen unter Umständen Energie, die möglicherweise zu der Beeinträchtigung des gesamten Energiehaushaltes der Zellen führt. Die Lokalisierung der Mitochondrien könnte aber auch direkter zur Pathogenese beitragen. So wurde in Bezug auf Chorea Huntington tatsächlich eine Störung des Energiehaushaltes beschrieben. Aus Huntington Patienten isolierte Lymphoblasten erwiesen sich gegenüber aus Kontrollpersonen gewonnenen Lymphoblasten als streßempfindlicher. Dies drückte sich in einer gesteigerten Depolarisierung der Mitochondrienmembran aus. Der beobachtete Einfluß auf Mitochondrien war jedoch nicht mit der Entstehung von Aggregaten korreliert (Sawa *et al.*, 1999). Die Störung der mitochondrialen Funktion schien außerdem spezifisch für Chorea Huntington zu sein, da in Kontrollansätzen mit aus SCA-1 Patienten gewonnenen Lymphoblasten kein Einfluß auf die mitochondriale Funktion zu beobachten war (Sawa *et al.*, 1999). Ob die mitochondriale Funktion in degenerativem Gewebe von SBMA Patienten gestört ist und ob AR enthaltende Aggregate daran beteiligt sind ist unklar und bleibt zu erforschen.

Da die Bildung der beschriebenen Aggregate hormonabhängig geschieht ergibt sich daraus die Frage nach der Beteiligung der Hormonbindedomäne an der Ausbildung dieser Strukturen. Zunächst hatte die Expression einer Rezeptormutante ohne Hormonbindedomäne unabhängig von der Länge ihrer Glutaminsequenz nicht die Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten zur Folge sondern lokalisierte konstitutiv im Kern. Weiterhin hatte die Behandlung der ARQ22, ARQ77 oder auch ARdNLSQ77 exprimierenden Zellen mit Antihormonen nicht die Bildung von zytoplasmatischen Strukturen zur Folge. Darüberhinaus inhibierte das Antihormon CPA die DHT induzierte Bildung von Aggregaten. Da Antihormone auch die DHT induzierte Transaktivierungsfunktion des Rezeptors inhibieren, ohne selbst Transaktivierung durch den Rezeptor zu bewirken (Berrevoets *et al.* 1993) erfordert die Bildung der Aggregate möglicherweise die gleichen strukturellen Eigenschaften des Rezeptors. Falls eine Verbindung zwischen der im Zellsystem beobachteten Bildung zytoplasmatischer Aggregate und der Pathogenese der spinalen und bulbären Muskelatrophie besteht, ist die Beobachtung, daß ihre Bildung durch Antihormone inhibiert werden kann möglicherweise ein interessanter

therapeutischer Ansatzpunkt der in einem Tiermodell für SBMA zu testen wäre. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß SBMA Patienten aufgrund der bei ihnen zu beobachtenden milden Anzeichen von Androgeninsensitivität einer Hormontherapie unterzogen wurden (Neuschmid-Kaspar et al., 1995). Diese Form der Behandlung ergab keine merkliche Verbesserung der Symptome. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stellt eine Antihormontherapie möglicherweise eine effektivere Alternative dar.

.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäuren
BSA	Rinderserumalbumin
CCS	mit Aktivkohle behandeltes FCS (<i>charcoal stripped calf serum</i>)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyterminus
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DBD	DNA-Bindedomäne
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E ₂₆₀ , E ₂₈₀	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Amino-ethylether) -Tetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	relative Erdbeschleunigung
GR	Glucocorticoidrezeptor
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hAR	menschlicher Androgenrezeptor
HBD	Hormonbindedomäne
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
Kac	Kaliumacetat
kb	Kilobasen (1000 Basen)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LBD	ligandenbindende Domäne
M	molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
mCi	Millicurie
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
Na-Acetat	Natriumacetat
NFκB	<i>nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
nm	Nanometer

NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pmol	Pikomol
SBMA	spinale und bulbäre Muskelatrophie
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Appendix

Tab. 3: Durchschnittliche Phasenwerte der Hormon abhängigen bzw. unabhängigen Lokalisierung des AR nach 0,5 h bzw. 1,5 h

		0,5 h		1,5 h	
		Φ Phase	Standartabw.	Φ Phase	Standartabw.
1	ARQ1-DHT	1,9	0,06	2,2	0,02
2	ARQ1+DHT	3,4	0,2	4	0
3	ARQ22-DHT	1,3	0,04	1,3	0,15
4	ARQ22+DHT	2,8	0,15	3,5	0,1
5	ARQ77-DHT	1,0	0,08	1,05	0
6	ARQ77+DHT	1,6	0,24	3,8	0,1

Durchführung des Experimentes wie unter Abb. 9 in Abschnitt 3.6 beschrieben. ϕ Phase gibt die durchschnittliche Phasenverteilung der unterschiedlichen Rezeptoren (ARQ1, ARQ22 bzw. ARQ77) zum Zeitpunkt 0,5 h bzw. 1,5 h an. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Auszählungen von insgesamt 11000 Zellen.

Tab. 4 A: Hormon abhängige bzw. unabhängige Lokalisierung der Rezeptorvarianten ohne bzw. mit Nocodazol nach 0,5 h

		-Nocodazol	+Nocodazol
		1	ARQ1-DHT
2	ARQ1+DHT	3,4	3,3
3	ARQ22-DHT	1,0	1,0
4	ARQ22+DHT	3,0	2,9
5	ARQ77-DHT	1,0	0,5
6	ARQ77+DHT	2,2	2,0

Tab. 4 B: Hormon abhängige bzw. unabhängige Lokalisierung der Rezeptorvarianten ohne bzw. mit Nocodazol nach 1,5 h

		-Nocodazol	+Nocodazol
1	ARQ1-DHT	2,2	1,7
2	ARQ1+DHT	3,8	3,8
3	ARQ22-DHT	0,8	1,0
4	ARQ22+DHT	3,6	3,4
5	ARQ77-DHT	0,8	0,8
6	ARQ77+DHT	3,9	3,8

Hormon abhängige und unabhängige Lokalisierung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten in Abhängigkeit von Mikrotubuli. (A) Phasenverteilung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten nach 0,5 h bei Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Nocodazol. (B) Phasenverteilung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten nach 1,5 h bei Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Nocodazol. Durchführung des Experimentes wie unter Abb.10 in Abschnitt 3.7 beschrieben.

Literatur

- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971-983.
- Adam, E. & Adam, S.A. (1994): Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.*, **125**, 547-555
- Adam, S.A. (1999): Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**, 402-406.
- Akner, G., Sundqvist, K.G., Denis, M., Wikstrom, A.C. & Gustafsson, J.A. (1990): Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in human gingival fibroblasts and evidence for a colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules. *Eur. J. Cell. Biol.*, **53**, 390-401.
- Akner, G., Wikstrom, A.C. & Gustafsson, J.A. (1995): Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 1-16.
- Barsony, J. & McKoy, W. (1992): Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24457-24465.
- Becher, M.W., Kotzuk, J.A., Sharp, A.H., Davies, S.W., Bates, G.P., Price, D.L. & Ross, C.A. (1998): Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis*, **4**, 387-397.
- Berrevoets, C.A., Veldscholte, J. & Mulder, E. (1993): Effects of antiandrogens on transformation and activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 731-736.

- Bingham, P.M., Scott, M.O., Wang, S., McPhaul, M.J., Wilson, E.M., Garbern, J.Y., Merry, D.E. & Fischbeck, K. H. (1995): Stability of an expanded trinucleotide repeat in the androgen receptor gene in transgenic mice *Nat. Genet.*, **9**, 191-196.
- Bohen, S.P., Kralli, A. & Yamamoto, K.R. (1995): Hold 'em and fold 'em: chaperones and signal transduction *Science*, **268**, 1303-1304.
- Brooks, B.P., Paulson, H. L., Merry, D.E., Salazar-Grueso, E.F., Brinkmann, A.O., Wilson, E. M. & Fischbeck, K.H. (1997): Characterization of an expanded glutamine repeat androgen receptor in an neuronal cell culture system. *Neurobiol. Disease*, **4**, 313-323
- Brown, C.J., Goss, S.J., Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Wilson, E.M., French, F.S. & Willard, H.F. (1989): Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 264-269.
- Burke, J.R., Enghild, J.J., Martin, M.E., Jou, Y.S., Myers, R.M., Roses, A.D., Vance, J.M. & Strittmatter, W.J. (1996): Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat. Med.*, **2**, 347-350.
- Caplan, A.J., Langley, E., Wilson, E.M. & Vidal, J. (1995): Hormone-dependent transactivation by the human androgen receptor is regulated by a dnaJ protein. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5251-5257.
- Caskey, C.T., Pizzuti, A., Fu, Y.H., Fenwick, R.G., Jr. & Nelson, D.L. (1992): Triplet repeat mutations in human disease. *Science*, **256**, 784-789.
- Chamberlain, N.L., Driver, E.D. & Miesfeld, R.L. (1994): The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic. Acids. Res.*, **22**, 3181-3186.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. & Pandolfo, M. (1996): Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423-1427.

- Choong, C.S., Kemppainen, J.A., Zhou, Z.X. & Wilson, E.M. (1996): Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 1527-1535.
- Chung, M.Y., Ranum, L.P., Duvick, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. & Orr, H.T. (1993): Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat. Genet.*, **5**, 254-258.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Cato, A.C.B., Hittmair, A., Radmayr, C., Eberle, J., Bartsch, G. & Klocker, H. (1993a): Mutant androgen receptor detected in an advanced stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1541-1550.
- Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M. & Pratt, W.B. (1995): Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 1549-1560.
- Danek, A., Witt, T.N., Mann, K., Schweikert, H.U., Romalo, G., LaSpada, A. R. & Fischbeck, K. H. (1994): Decrease in androgen binding and effect of androgen treatment in a case of X-linked bulbospinal neuronopathy. *Clin. Invest.* **72**, 892-897
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L. & Bates, G.P. (1997): Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**, 537-548.
- Di Domenico, M., Castoria, G., Bilancio, A., Migliaccio, A. & Auricchio, F. (1996) Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.*, **56**, 4516-4521.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A. *et al.* (1995): Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, **14**, 1075-1081.

- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, **277**, 1990-1993.
- Erickson, H.P. (1998): Atomic structures of tubulin and FtsZ. *Trends Cell Biol.*, **8**, 133-137
- Eul, J., Meyer, M.E., Tora, L., Bocquel, M.T., Quirin-Stricker, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1989): Expression of active hormone and DNA-binding domains of the chicken progesterone receptor in E. coli. *EMBO J.*, **8**, 83-90.
- Evans, R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895
- Ferlini, A., Patrosso, M.C., Guidetti, D., Merlini, L., Uncini, A., Ragno, M., Plasmati, R., Fini, S., Repetto, M., Vezzoni, P. et al. (1995): Androgen receptor gene (CAG)_n repeat analysis in the differential diagnosis between Kennedy disease and other motoneuron disorders. *Am. J. Med. Genet.*, **55**, 105-111.
- Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G., Jr., Warren, S.T. et al. (1991): Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, **67**, 1047-1058.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. & Prehn, S. (1995): Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.*, **5**, 383-392.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. & Bischoff, F.R. (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J.*, **15**, 5584-5594.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A. & Hartmann, E. (1994): Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**, 767-778.
- Gundersen, G.G. & Cook, T.A. (1999): Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 81-94.
- Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Bader, P.I., Phelan, M.C., Stevenson, R., Hayden, M.R., Hofman, K.J., Faryniarz, A.G. & Gibbons, K. (1985): Deletion of Huntington's disease-linked G8 (D4S10) locus in Wolf- Hirschhorn syndrome. *Nature*, **318**, 75-78.

- Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J. & Hersch, S.M. (1995): Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 8710-8714.
- Green S. & Chambon, P. (1988): Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, **4**, 309-314.
- Green, H. (1993): Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell*, **74**, 955-956
- Hackam, A.S., Singaraja, R., Zhang, T., Gan, L. & Hayden, M.R. (1999): In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 25-33.
- Hanahan, B. (1986): Techniques for the transformation of E. coli DNA cloning, pp 109-135. In D.M. Glover (Ed.), IRL Press, Oxford.
- Hardy, J. & Gwinn-Hardy, K. (1998): Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science*, **282**, 1075-1079.
- Hibata, H., Spencer, T.E., Onate, S.A., Jenster, G., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. & O'Malley B.W. (1997): Role of coactivators and corepressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog. Horm. Res.*, **52**, 141-165
- Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X.J., Stevens, M.E., Rosemond, E., Roder, J.C., Phillips, A.G., Rubin, E.M., Hersch, S.M. & Hayden, M.R. (1999): A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, **23**, 181-192.
- Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trottier, Y., Hirsch, E.C., Agid, Y. & Brice, A. (1998): Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 913-918.

- Housley, P.R., Sanchez, E.R., Danielsen, M., Ringold, G.M. & Pratt, W.B. (1990): Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11928-11935.
- Hsiao, P.W., Lin, D.L., Nakao, R. & Chang, C. (1999): The linkage of Kennedy's neuron disease to ARA24, the first identified androgen receptor polyglutamine region-associated coactivator. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20229-20234.
- Huynh, D.P., Del Bigio, M.R., Ho, D.H. & Pulst, S.M. (1999): Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann. Neurol.*, **45**, 232-241.
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S. & Kakizuka, A. (1996): Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat. Genet.*, **13**, 196-202.
- Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J.M., Weber, C., Mandel, J.L., Cancel, G., Abbas, N., Durr, A., Didierjean, O., Stevanin, G., Agid, Y. & Brice, A. (1996): Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat. Genet.*, **14**, 285-291.
- Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (1999): Abundant expression and cytoplasmic aggregations of [alpha]1A voltage- dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1185-1193.
- Jenster, G., van der Korput, H.A.G.M., van Vroonhoven, C., van der Kwast, T.H., Trapman, J. & Brinkmann, A.O. (1991): Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1396-1404.
- Jenster, G., Trapman, J. & Brinkmann, A.O. (1993): Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem. J.*, **293**, 761-768.

- Jodice, C., Mantuano, E., Veneziano, L., Trettel, F., Sabbadini, G., Calandriello, L., Francia, A., Spadaro, M., Pierelli, F., Salvi, F., Ophoff, R.A., Frants, R.R. & Frontali, M. (1997): Episodic ataxia type 2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) due to CAG repeat expansion in the CACNA1A gene on chromosome 19p. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1973-1978.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. & Kopito, R.R. (1998): Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell. Biol.*, **143**, 1883-1898.
- Kahlem, P., Terre, C., Green, H. & Djian, P. (1996): Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 14580-14585.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S. & Kakizuka, A. (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.*, **8**, 221-228.
- Kazemi-Esfarjani, P., Trifiro, M. A. & Pinsky, L. (1995): Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expandend neuronopathies. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 523-527.
- Kennedy, W.R., Alter, M. & Sung, J.H. (1968): Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology*, **18**, 671-680.
- Kim, T.W. & Tanzi, R.E. (1998): Neuronal intranuclear inclusions in polyglutamine diseases: nuclear weapons or nuclear fallout? *Neuron*, **21**, 657-659.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y. & Orr, H.T. (1998): Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, **95**, 41-53.
- Klockgether, T. & Dichgans, J. (1997): Trinucleotide repeats and hereditary ataxias [news]. *Nat. Med.*, **3**, 149-150.
- Klockgether, T. & Evert, B. (1998): Genes involved in hereditary ataxias. *Trends Neurosci.*, **21**, 413-418.

- Koshy, B., Matilla, T., Burrigh, E.N., Merry, D.E., Fischbeck, K. H., Orr, H.T. & Zoghbi, H. Y. (1996): Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1311-1318.
- Kuil, C.W., Berrevoets, C.A. & Mulder, E. (1995): Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27569-27576.
- Kull, J. & Fletterick, R.J. (1998): Is the tubulin/FtsZ fold related to the Gprotein fold? *Trends Cell Biol.*, **8**, 306-307.
- Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- La Spada, A.R., Roling, D.B., Harding, A.E., Warner, C.L., Spiegel, R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Yee, W.C. & Fischbeck, K.H. (1992): Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Genet.*, **2**, 301-304.
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. & Fischbeck, K.H. (1991): Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, **352**, 77-79.
- La Spada, A.R., Peterson, K.R., Meadows, S.A., McClain, M.E., Jeng, G., Chmelar, R.S., Haugen, H.A., Chen, K., Singer, M.J., Moore, D., Trask, B.J., Fischbeck, K.H., Clegg, C.H. & McKnight, G.S. (1998): Androgen receptor YAC transgenic mice carrying CAG 45 alleles show trinucleotide repeat instability. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 959-967.
- Li, X.-J., Li, S.-H., Sharp, A.H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S.H. & Ross, C. A. (1995): A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, **378**, 398-402.
- Li, H., Li, S.H., Cheng, A.L., Mangiarini, L., Bates, G.P. & Li, X.J. (1999): Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1227-1236.

- Li, S.H. & Li, X.J. (1998): Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 777-782.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MacLean, H.E., Choi, W.T., Rekaris, G., Warne, G.L. & Zajac, J.D. (1995): Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 508-516.
- Mann, M. & Wilm, M. (1995): Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends. Biochem. Sci.*, **20**, 219-224.
- Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S.U., Bredesen, D.E., Tufaro, F. & Hayden, M.R. (1998): Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat. Genet.*, **18**, 150-154.
- McLaughlin, B.A., Spencer, C. & Eberwine, J. (1996): CAG trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding proteins. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 561-569.
- Merry, D.E., McCampbell, A., Taye, A.A., Winston, R. L. & Fischbeck, K.H. (1996): Toward a mouse model for spinal and bulbar muscular atrophy: effect of neuronal expression of androgen receptor in transgenic mice. *Am. J. Hum. Genet.*, **59** (Suppl.) A271.
- Merry, D.E. & Fischbeck, K.H. (1998): Genetics and molecular biology of the androgen receptor CAG repeat, pp 101-111. In *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*, Academic Press.
- Merry, D.E., Kobayashi, Y., Bailey, C.K., Taye, A.A. & Fischbeck, K.H. (1998): Cleavage, aggregation and toxicity of the expanded androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 693-701.
- Migeon, B.R., Brown, T.R., Axelman, J. & Migeon, C.J. (1981): Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **78**, 6339-6343.

- Miller, R.J. (1997): Calcium channels prove to be a real headache. *Trends Neurosci*, **20**, 189-192.
- Mhatre, A.N., Trifiro, M.A., Kaufman, M., Kazemi-Esfarjani, P., Figlewicz, D., Rouleau, G. & Pinsky, L. (1993): Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature Genet.*, **5**, 184-188
- Moroianu, J. & Blobel, G. (1995): Protein export from the nucleus requires the GTPase Ran & GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 4318-4322.
- Nakajama, H., Kimura, F., Nakagawa, T., Furutama, D., Shinoda, K., Shimizu, A. & Ohsawa, N. (1996): Transcriptional activation by the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.*, **142**, 12-16.
- Nakamura, M., Mita, S., Murakami, T., Uchino, M., Watanabe, S., Tokunaga, M., Kumamoto, T. & Ando, M. (1994): Exonic trinucleotide repeats and expression of androgen receptor gene in spinal cord from X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.*, **122**, 74-79.
- Neuschmid-Kaspar, F., Gast, A., Peterziel, H., Schneikert, J., Muigg, A., Ransmayr, G., Klocker, H., Bartsch, G. & Cato, A.C. (1996): CAG-repeat expansion in androgen receptor in Kennedy's disease is not a loss of function mutation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **117**, 149-156.
- Orr, H.T., Chung, M.Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J., Jr., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P. & Zoghbi, H.Y. (1993): Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat. Genet.*, **4**, 221-226.
- Palvimo, J.J., Kallio, P.J., Ikonen, T., Mehto, M. & Jänne, O. A. (1993): Dominant negative regulation of trans-activation by the rat androgen receptor: roles of the N-terminal domain and heterodimer formation. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1399-1407.
- Paulson, H.L. (1999): Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**, 339-345.

- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J.T. (1994): Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5355-5358.
- Perutz, M.F. (1999): Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 58-63.
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H. & Cato, A.C.B (1999): Rapid signalling by androgen receptor in prostate cells. *Oncogene*, **18**, 6322-6329.
- Quigley, C.A., Friedman, K.J., Johnson, A., Lafreniere, R.G., Silverman, L.M., Lubahn, D.B., Brown, T.R., Wilson, E.M., Willard, H.F. & French, F.S. (1992): Complete deletion of the androgen receptor gene: definition of the null phenotype of the androgen insensitivity syndrome and determination of carrier status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**, 927-933.
- Radu, A., Blobel, G. & Moore, M.S. (1995): Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1769-1773.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. & Dingwall, C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Ross, C.A. (1997): Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, **19**, 1147-1150.
- Ross, C.A. (1995): When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron*, **15**, 493-496.
- Sanger, R., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. & Greenberg, M.E. (1998): Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, **95**, 55-66.
- Sawa, A., Wiegand, G.W., Cooper, J., Margolis, R.L., Sharp, A.H., Lawler, J.F., Jr., Greenamyre, J.T., Snyder, S.H. & Ross, C.A. (1999): Increased apoptosis of

- Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat. Med.*, **5**, 1194-1198.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H. & Wanker, E.E. (1997): Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, **90**, 549-558.
- Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V. french, F.S. & Wilson, E.M. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 510-518.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P-A., Klocker, H., de Launoit, Y. & Cato, A.C.B. (1996): Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23907-23913.
- Smith, D. B. & Johnson, K.S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Smith, D.F. & Toft, D. O. (1993): Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 4-11.
- Sobue, G., Hashizume, Y., Mukai, E., Hirayama, M., Mitsuma, T. & Takahashi, A. (1989): X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain*, **112**, 209-232.
- Stenoien, D.L., Cummings, C.J., Adams, H.P., Mancini, M.G., Patel, K., DeMartino, G.N., Marcelli, M., Weigel, N.L. & Mancini, M.A. (1999): Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 731-741.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., Tora, L. et al. (1995): Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, **378**, 403-406.
- Truss, M. & Beato, M. (1993): Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.*, **14**, 459-479.

- Vallee, R.B. (1982): A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs). *J. Cell. Biol.*, **92**, 435-442.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Zegers, N.D., van der Kwast, T.H., Grootegoed, J.A. & Mulder, E. (1992): Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry*, **31**, 7422-7430.
- Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P. & et al. (1991): Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
- Warner, C.L., Griffen, J.E., Wilson, J.D., Jacobs, L.D., Murray, K.R., Fischbeck, K.H., Dickoff, D. & Griggs, R. C. (1992): X-linked spinomuscular atrophy; a kindred with associated abnormal androgen binding. *Neurology*, **42**, 2181-2184.
- Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V. & Wilson, E.M. (1994): A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13115-13123.
- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y. & Lee, C.C. (1997): Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.*, **15**, 62-69.