



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6180

**Androgenrezeptordefekte
in Patienten mit
Pseudohermaphroditismus**

A. Gast
Institut für Genetik

September 1998



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6180

**Androgenrezeptordefekte in Patienten mit
Pseudohermaphroditismus**

Andreas Gast

Institut für Genetik

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1998

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

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

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

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Molekularbiologische Untersuchungen von Androgenresistenzsyndromen haben zusätzliche Einblicke in die Wirkungsweise der Androgene und deren Rezeptor, des Androgenrezeptors (AR), während der embryonalen männlichen Geschlechtsentwicklung gegeben. Dabei zeigt sich, daß Mutationen im Androgenrezeptor die Ursachen für eine gestörte männliche Geschlechtsentwicklung sind. Fehlfunktionen (Mutationen) des Androgenrezeptors betreffen meist die Hormon- und DNA-Bindungsdomänen. Eine dritte wichtige Domäne ist die aminoternale Region des Androgenrezeptors. Sie besitzt transaktivierende und reprimierende Eigenschaften und spielt bei Interaktionen mit anderen Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren, oder Koaktivatoren) eine Rolle. Der Beitrag aminoterminaler Bereiche zur Transaktivierung, Repression und DNA-Bindung, ist bisher aber noch nicht so gut charakterisiert, wie die der beiden anderen Regionen des AR. Da die rezeptorvermittelte Androgenwirkung im Zellkern stattfindet, muß der Androgenrezeptor, der nicht von selbst in den Kern gelangen kann, durch sogenannte Kerntransportproteine durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Mutanten des Androgenrezeptors, die bei Patienten mit kompletter Androgeninsensitivität gefunden wurden, auf ihre Kerntranslokationseigenschaften untersucht. Durch Immunfluoreszenz- und Kernimportanalysen konnte gezeigt werden, daß die mutierten Androgenrezeptoren nach Androgenbehandlung nicht im Zellkern lokalisiert waren. Durch Protein-Protein-Interaktionsexperimente konnte weiterhin gezeigt werden, daß der erste Schritt des Kerntransports, die Bindung durch die Kerntransportproteine, nicht durch die Mutationen behindert wird. Es ist deshalb zu vermuten, daß nachfolgende Mechanismen des Kerntransports, die den Transport durch die Kernporen regeln, durch die Mutationen im Androgenrezeptor beeinflusst werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit werden die Funktionen des Aminoterminus des Androgenrezeptors mit Hilfe verschiedener N-terminaler Deletionsmutanten und chimärer Rezeptorkonstrukte analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß spezifische Sequenzen im N-terminalen Bereich zur transaktivierenden Eigenschaft des Rezeptors beitragen. Hingegen ist die Funktion dieses Bereiches bei der DNA-Bindung sequenzspezifischer Natur und somit auf die Stabilisierung des Rezeptor-Homodimers an der DNA zurückzuführen. Stabilisierende Eigenschaften des N-Terminus des Androgenrezeptors werden auch für die Repression benötigt, wobei diese, wie der Beitrag zur DNA-Bindung, nicht sequenzspezifisch sind, sondern auf strukturelle Veränderungen oder Interaktion mit Proteinen beruhen.

Desweiteren wurde eine Mutation im N-Terminus des Androgenrezeptors eines Patienten mit Reifensteinsyndrom charakterisiert. Genitalhautfibroblasten des Patienten wurden in Protein- und RNA-Analysen untersucht und zusätzlich transiente Transfektionsexperimente mit einem Expressionsvektor, der den mutierten AR enthält, durchgeführt. Sowohl die Genitalhautfibroblasten als auch transient transfizierte Cos-7 Zellen zeigten eine Reduktion in der Rezeptorprotein- und mRNA-Menge. RNA-Gelretardationsuntersuchungen zeigten eine zellspezifische Bindung von Protein an die mutierte mRNA. Es kann deshalb postuliert werden, daß ein spezifisches Protein (Proteine) die Mutation in der mRNA des Patienten mit partieller Androgeninsensitivität erkennen und daran binden und dies zu einer Degradation der mRNA führt.

Androgen Receptor Defects in Patients with Pseudohermaphroditism

Abstract

Molecular investigations of androgen resistance syndromes give an insight into the physiological function of androgen and the androgen receptor (AR) during male embryonic sexual development. It has been shown that mutations in the androgen receptor are the cause for a disturbed male sexual development. Malfunctions (mutations) in the androgen receptor mostly affect the hormone- and DNA-binding domains. A third important domain is the amino terminal region of the androgen receptor. It possesses transactivating and repressing potential and plays a role in the interaction with other proteins (e.g. transcription factors or coactivators). The contribution of amino terminal regions to transactivation, transrepression and DNA-binding is not as well characterized as for the other two domains of the AR. As androgen-mediated action of the AR takes place in the nucleus, this receptor which is initially outside the nucleus, needs to be transported with the help of nuclear transport proteins through the nuclear pore into the nucleus.

In the first part of this work, two different mutants of the androgen receptor isolated from patients with complete androgen insensitivity were analyzed for their ability to be translocated into the nucleus. Immunofluorescence and nuclear import assays showed that upon hormone treatment, the mutant androgen receptors were unable to enter the nucleus. Protein-protein interaction experiments further indicated that the first step of the nuclear import, which involves the binding of the receptor to nuclear transport factors, was not affected by the mutations. It is therefore likely that subsequent steps encompassing transport through the nuclear pore, are influenced by the mutations in the androgen receptor.

In the second part of this work, the function of the N-terminal region of the AR was analyzed with the help of N-terminal deletion mutants and chimeric receptor constructs. It was shown that specific sequences in the amino terminus contributed to transactivation by the receptor. However, this region did not contribute to DNA-binding in a sequence-specific manner. But its effects on this function of the receptor is most likely to stabilize the androgen receptor homodimers on the DNA. The stabilizing effects of the N-terminus of the androgen receptor are also needed for the repression function of the receptor. In this case too, their contribution is not sequence-specific but is based on structural alterations or interaction with other proteins.

Furthermore a mutation in the N-terminal region of the androgen receptor from a patient with Reifenstein syndrome was investigated. Genital skin fibroblasts of the patient were analysed in protein- and RNA-binding-experiments and in addition transient transfection studies with the mutated receptor expression vector were carried out. In these studies both genital skin fibroblasts and the transfected COS-7 cells showed reduced level of mutated receptor-protein and mRNA. In RNA-electrophoretic mobility shift assays, specific binding of cellular protein(s) to the mutated RNA-oligonucleotide-sequence was observed. The binding correlated with the reduced amount of the mutated AR protein and mRNA. It was therefore postulated that specific protein(s) recognize the mutation in the mRNA of the patient with Reifenstein syndrome and that the binding of these proteins leads to an enhanced degradation of the mutated mRNA.

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Normale männliche Geschlechtsentwicklung und Androgenrezeptor.....	1
1.1.1 Normale männliche Geschlechtsentwicklung	1
1.1.2 Struktur und Funktion des Androgenrezeptors	2
1.1.3 Wirkung der Androgene.....	6
1.2 Androgeninsensitivität.....	9
1.2.1 Komplette Androgeninsensitivität	10
1.2.2 Partielle oder inkomplette Androgeninsensitivität.....	10
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	12
2 Ergebnisse	13
2.1 Ergebnisse 1. Teil: Untersuchung von zwei Mutationen des menschlichen Androgenrezeptors aus Patienten mit Androgeninsensitivität	13
2.1.1 Ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 615, nicht aber Arginin zu Prolin an Position 617 im Androgenrezeptor, verhindert DNA-Bindung	14
2.1.2 Zelluläre Lokalisierung des Androgenrezeptors und der Mutanten AR-R615H und AR-R617P.....	16
2.1.3 Die Mutationen R615H und R617P hemmen den Kerntransport von AR-NLS-Fusionsproteinen <i>in vitro</i>	19
2.1.4 Importin- α und Importin- β erkennen das NLS vom menschlichen Androgenrezeptor und dessen NLS-Mutanten AR-R615H und AR-R617P.....	21
2.2 Ergebnisse 2. Teil: Charakterisierung der Funktion von N-terminalen Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors und einer natürlich vorkommenden Mutation im AR eines Patienten mit Reifensteinsyndrom.....	27
2.2.1 Die DNA-Bindung des Androgenrezeptors ist nicht von spezifischen N-terminalen Sequenzen abhängig.....	28
2.2.2 Transaktivierende und transreprimierende Eigenschaften des N-Terminus vom Androgenrezeptor	34
2.2.3 Eine natürlich vorkommende N-terminale Mutation (G474E) im Androgenrezeptor	40
2.2.4 Genitalhautfibroblasten des Patienten mit partieller Androgen- insensitivität enthalten weniger Rezeptorprotein und AR-mRNA	41
2.2.5 Auch in transienten Experimenten führt die Mutation G474E zu reduzierten Mengen an Rezeptorprotein.....	46
2.2.6 Die Mutation G474E führt zu einem inaktiven Androgenrezeptor in Transaktivierungs-, Transreprimierungs- und Gelretardationsanalysen.....	47

2.2.7	Die verminderte Proteinmenge der Mutante AR-G474E resultiert aus einer geringeren m-RNA-Menge.....	50
2.2.8	Eine Sequenz der mutierten AR-mRNA des Patienten mit partieller Androgeninsensitivität bildet spezifische RNA-Protein-Komplexe mit Extrakten von Cos-7 Zellen und Genitalhautfibroblasten	52
3	Diskussion.....	60
3.1	Komplette Androgeninsensitivität infolge eines Defekts im Kerntransport des Androgenrezeptors.....	60
3.2	Funktion aminoterminaler Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors bei der Transaktivierung, Transrepression und DNA-Bindung	69
4	Material und Methoden.....	76
Material		
4.1	Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	76
	Radiochemikalien	78
	Enzyme.....	79
4.2	Oligonukleotide.....	79
4.3	Plasmidkonstrukte	81
4.4	Antikörper.....	84
4.5	Bakterien	85
4.6	Zelllinien und Kulturbedingungen	85
Methoden		
4.7	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren.....	86
	Phenol/Chloroform-Extraktion	86
	Fällung von Nukleinsäuren	87
	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	87
4.8	DNA-Klonierungstechniken	87
	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	87
	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese.....	87
	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	88
	Ligation von DNA-Fragmenten	88
	Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction, PCR</i>)	88
	Präparation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1986).....	89
	Transformation von Bakterien (nach Hanahan, 1986).....	89
4.9	Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien..	89
	Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxipräp")	89
	Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Minipräp")	90

4.10	Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte	90
	Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977)	90
	Auftrennung der Sequenzierreaktionen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	91
4.11	Radioaktive Markierung und Reinigung von Sonden für RNA- Hybridisierungen	92
	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	92
	Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	92
4.12	Analyse von RNA durch Transfer auf Membranen und Detektion durch radioaktiv markierte DNA-Fragmente (<i>Northern blot</i>)	92
	Präparation von poly A ⁺ RNA aus Zellen	92
	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	93
	<i>Northern blot</i> und Hybridisierung	94
4.13	Analyse von RNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR)	95
	Präparation von poly A ⁺ RNA aus Zellen	95
	Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	95
	Amplifikation der Erststrang-cDNA mittels PCR	95
4.14	Zellkultur	96
	Kultivieren und Trypsinieren von Zellen	96
	Einfrieren und Auftauen von Zellen	96
	Herstellung von CCS (<i>charcoal calf serum</i>) für Immunfluoreszenz- färbung nach Westley und Rochefort, 1980)	96
4.15	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen	97
	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951)	97
	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS- Polyacrylamidgele (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)	97
	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	98
4.16	Transiente Transfektionen	98
	Kalziumphosphat-Methode (nach Graham und van der Eb, 1973)	98
	Elektroporation (Eul et al., 1989)	99
4.17	Analyse der Genexpression durch den Luciferase-Aktivitätstest (nach de Wet et al., 1987)	99
	Präparation von Proteinextrakten für Luciferase-Analysen	99
	Luciferase-Aktivitätstest	100
4.18	Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (<i>Western blot</i>)	100
	Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den <i>Western blot</i>	100
	<i>Western blot</i> und Detektion von Proteinen auf Membranen	100
4.19	Analyse von Proteinen-DNA-Interaktionen	101
	Präparation von Proteinextrakten für Gelretardationsanalysen	101
	Herstellung des doppelsträngigen Oligonukleotids ARE für DNA-Gelretardationsanalyse	101
	Radioaktive Markierung des DNA-Oligonukleotids	102
	DNA-Gelretardationsanalyse (Barberis et al., 1987)	102

4.20	Analyse von Proteinen-RNA-Interaktionen.....	103
	Präparation von Proteinextrakten für RNA-Gelretardationsanalysen.....	103
	Radioaktive Markierung von RNA-Oligonukleotiden.....	103
	RNA-Gelretardationsanalyse.....	103
4.21	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST- Fusionsproteinen.....	103
	<i>In vitro</i> Transkription/Translation und Verdau der Proteine.....	103
	Produktion und Reinigung von Gluthathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen.....	104
	GST-Fusionsprotein-Interaktionstest (<i>pull down</i>).....	105
4.21	Analyse des Kernimports von Proteinen (<i>nuclear import assay</i> , nach Adam et al. 1990 und Weis et al. 1995).....	106
	Produktion und Reinigung von (β -GAL)- <i>Histaq</i> -Fusionsproteinen.....	106
	Permeabilisierung von HeLa Zellen (Weis et al., 1995).....	106
	Präparation von Zellextrakten für <i>in vitro nuclear import assay</i>	107
	<i>in vitro</i> Kernimportanalyse (<i>in vitro nuclear import assay</i>) und Proteindetektion.....	107
4.23	Analyse des Kernimports von Proteinen durch Immunfluoreszenzfärbung....	108
	Präparation und Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung.....	108
	Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern.....	108
 Abkürzungen		110
 Literatur		114

1 Einleitung

„De hermaphroditorum natura“ hieß die Überschrift eines Artikels von Steglehner, der vor über 180 Jahren erschien (Steglehner G., 1817, zitiert von Leopold, 1875), und in dem der Fall eines männlichen Scheinzitters (Pseudo-Hermaphroditismus masculinus externus), wohl zum ersten mal wissenschaftlich bekundet wurde. Eine klassische Definition der „testikulären Feminisierung“, die sich auf Untersuchungen von 82 Individuen stützte, wurde erst 1953 von Morris festgelegt (Morris J.M., 1953). Seither konnten viele Aspekte in der sexuellen Differenzierung beim Mann, die zu Scheinzwittertum führen, aufgedeckt werden.

1.1 Normale männliche Geschlechtsentwicklung und Androgenrezeptor

1.1.1 Normale männliche Geschlechtsentwicklung

Der Beginn der männlichen Geschlechtsentwicklung erfolgt mit der Befruchtung. Hier wird der heterogametische männliche Karyotyp 46XY, durch Kombination der Geschlechtschromosomen X (von der Frau) und Y (vom Mann), festgelegt (Griffin und Wilson, 1989). Die embryonale Geschlechtsentwicklung des Menschen verläuft in den ersten Wochen identisch, wobei die Anlagen für die Ausbildung beider Geschlechter (indifferente Gonaden und externe Genitalien, Müller'sche und Wolff'sche Gänge) vorhanden sind (Quigley et al., 1995). Mit der Expression des Testis determinierenden Faktors (TDF), dessen Gen SRY (Sex-determinierende Region des Y-Chromosoms) auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist (Sinclair et al., 1990), beginnt ab der sechsten Woche die Ausbildung des gonadalen Geschlechts. Dieser Faktor leitet die Differenzierung der indifferenten Gonaden ein, welche sich beim Mann zu Hoden entwickeln. Die Hodenentwicklung ist also kein Androgen-abhängiger Prozeß (Quigley et al., 1995). Nach der Sex-Determination (Hodenentwicklung) erfolgt die Geschlechtsdifferenzierung, wobei zwei Hormone eine wichtige Rolle spielen. Sertoli-Zellen, die sich aus den primären Gonadensträngen entwickeln, produzieren das Anti-Müller-Hormon (oder Müllerinhibitor), ein Polypeptid, das für die Regression der Müller'schen Gänge zuständig ist, wodurch die Ausbildung weiblicher innerer Geschlechtsorgane unterdrückt wird (Jost, 1990). Durch die Sertoli-Zellen wird auch die Differenzierung der Leydig-Zellen aus interstitiellem

Gewebe der Hoden induziert. Diese wiederum produzieren ein weiteres, für die männliche Geschlechtsentwicklung sehr wichtiges Sexualhormon, das Testosteron (T). Testosteron ist für die Entwicklung der Nebenhoden, Samenleiter und akzessorische Geschlechtsdrüsen (Prostata und Samenblasen) verantwortlich (Griffin und Wilson, 1989). Nach Abschluß der Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane wird, ab der 13. Schwangerschaftswoche, ein weiteres wichtiges männliches Sexualhormon, Dihydrotestosteron (DHT), durch Umformung von Testosteron, durch das Enzym 5 α -Reduktase, gewonnen (Beaulieu, 1990, Quigley et al., 1995). DHT ist hauptsächlich für die Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane zuständig. Es induziert die Entwicklung der Harnröhre, des Penis, des Hodensacks (Skrotum) und des Drüsengewebes der Prostata (Reinboth, 1980). Für die Vermittlung der androgenen Wirkung beider Hormone, T und DHT, ist die Anwesenheit eines funktionsfähigen Rezeptors, des Androgenrezeptors, notwendig. Störungen der Androgenwirkung, sei es durch Produktion oder Umformung der männlichen Sexualhormone oder eine Fehlfunktion des Androgenrezeptors können beim Mann zu unterschiedlich schweren Defekten in der Entwicklung des männlichen Geschlechts führen. (Zur Übersicht siehe u. a. Reinboth, 1980, Griffin und Wilson, 1989, Jost, 1990, Baulieu, 1990, Quigley et al., 1995 und Wiener et al., 1997.)

1.1.2 Struktur und Funktion des Androgenrezeptors

Durch Diffusion gelangen die Androgene durch die Membranen von Zellen jedoch nur in Zellen, die ein bestimmtes Protein, den Androgenrezeptor, exprimieren, können sie ihre Wirkung vermitteln. Der Androgenrezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der Weiterleitung des androgenen Signals, welches für eine normale Differenzierung und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane verantwortlich ist.

Der Androgenrezeptor gehört zu einer Gruppe von verwandten Steroidhormonrezeptoren, die sich neben Sequenzähnlichkeiten, auch durch die Fähigkeit auszeichnen, über die Bindung an ein gemeinsames DNA-Element (*hormone responsive element*, HRE), Transaktivierung von Zielgenen zu vermitteln (Quigley et al., 1995). Zu dieser Gruppe zählen außer dem AR auch der Glukokortikoid-, der Progesteron- und der Mineralokortikoidrezeptor. Sie stellt eine Untereinheit der Superfamilie der Kernrezeptoren dar. Zu den Kernrezeptoren werden weiterhin der Östrogenrezeptor, der Thyroidhormonrezeptor, der Vitamin-D-Rezeptor, die Retinsäurerezeptoren und eine Anzahl von weiteren Rezeptoren, für die bis jetzt noch keine Liganden gefunden wurden, gezählt (Mangelsdorf et al., 1995, Quigley et al., 1995).

Das Gen des Androgenrezeptors liegt als Einzelkopie auf dem X-Chromosom vor und überspannt eine Länge von 90 kb (Migeon et al., 1981, Kuiper et al. 1989, Quigley et al.,

1995, Abb. 1). Die proteinkodierende cDNA, mit einer Größe von etwa 2759 Basenpaaren (die Anzahl ist durch die Länge der homopolymeren Regionen im N-Terminus (siehe weiter unten) unterschiedlich), umfaßt 8 Exons, die eine mRNA von ca. 9,6 kb kodieren und ein Protein von 910-919 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 110-112 Kilodalton (kD) exprimieren (Lubahn et al., 1988, Trapmann et al., 1988, Chang et al., 1988, Tilley et al., 1989, Jenster et al., 1991, siehe auch Abb. 1).

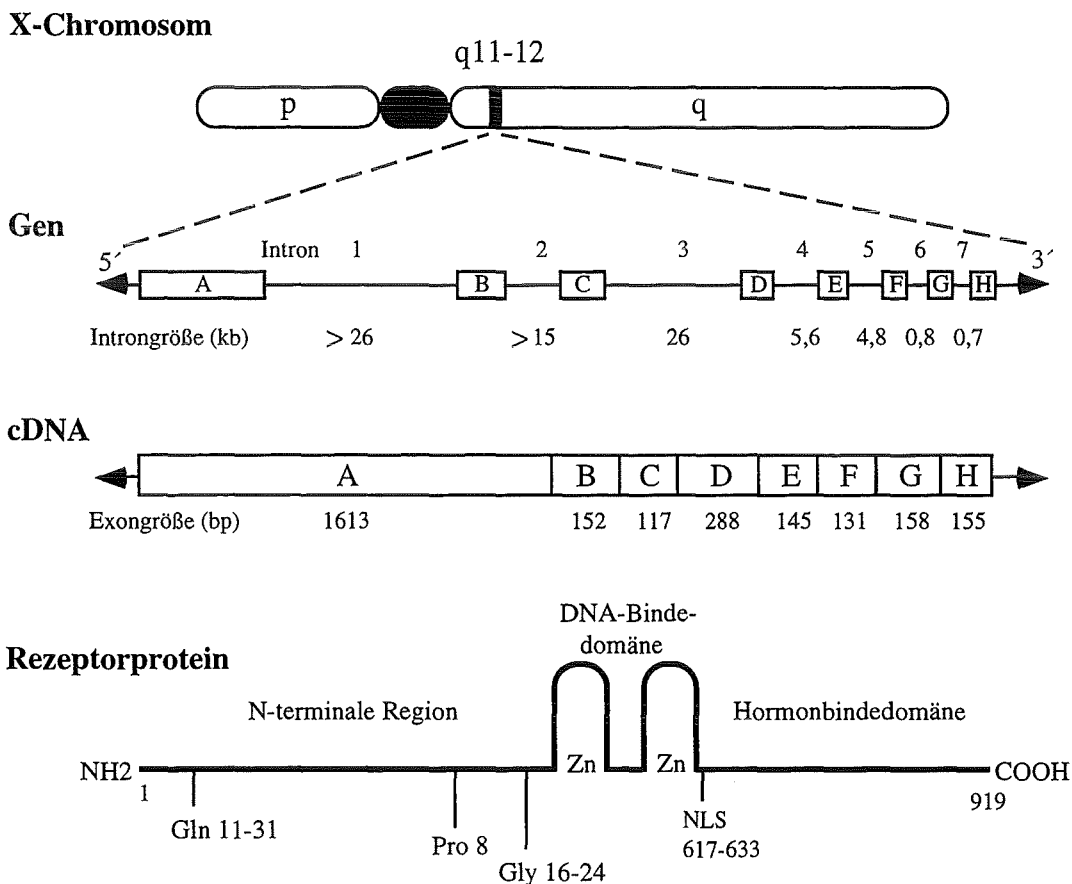


Abb. 1: Schematische Darstellung des X-Chromosoms, des AR-Gens, der cDNA und des AR-Proteins. Das AR-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms an Position Xq11-12 lokalisiert. Das Gen besteht aus 8 Exons und 7 Introns, die etwa 2759 Basenpaare an cDNA exprimieren. Das Rezeptorprotein besteht aus ca. 919 Aminosäuren, wobei die Zahl durch die homopolymeren Regionen im N-Terminus variieren kann. Das Protein wird in 3 Hauptregionen eingeteilt, N-Terminus, DNA-Bindedomäne (DBD) und Hormonbindedomäne (HBD). Zwischen DBD und HBD liegt das Kernlokalisierungssignal (NLS). Zn zeigt die Position der „Zinkfinger“ an. Gln=homopolymere Glutaminregion, Pro= homopolymere Prolinregion, Gly= homopolymere Glycinregion.

Der Androgenrezeptor besitzt, wie alle Steroidhormonrezeptoren, drei Hauptdomänen, eine N-terminale Modulatorregion, die zwischen den Steroidhormonrezeptoren geringe Homologie aufweist, eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), die in dieser Familie sehr gut konserviert ist, und eine C-terminale Hormonbindungsdomäne (HBD), mit wenig Homologie zwischen den Steroidhormonrezeptoren (Beato, 1989 u. 1993, Abb. 1).

Der N-Terminus, besitzt transaktivierende (Transkriptionsaktivierung) Eigenschaften, wozu hauptsächlich die Aminosäuren 141-338 beitragen (Simental et al., 1991, Jenster et al., 1991 u. 1992). Zwei Bereiche AF-1a (*activator function 1a*, Aminosäuren 154-167) und AF-1b (Aminosäuren 295-359) wurden von Chamberlain et al. beschrieben. Die Autoren zeigten, daß beide Untereinheiten separat zur maximalen transaktivierenden Funktion des AR beitragen, aber keine reprimierenden Eigenschaften besitzen (Chamberlain et al., 1996). Eine weitere Funktion ist die Stabilisierung der DNA-Bindung durch Interaktion mit Proteinen. Kupfer et al. zeigten, daß durch Interaktion des N-Terminus mit dem *insulin degrading enzyme* (IDE), die DNA-Bindung des Androgenrezeptors verstärkt wurde (Kupfer et al., 1993 u. 1994). Weiterhin scheint der N-Terminus des AR bei der Stabilisierung des Rezeptorproteins durch interne Wechselwirkung mit dem C-Terminus eine Rolle zu spielen (Zhou et al., 1995). Besonderheiten des N-Terminus sind drei homopolymere Aminosäurenregionen, eine Glutaminregion, eine Prolinregion und ein homopolymerer Glycinbereich (Abb. 1). Die Funktion dieser Bereiche ist noch nicht aufgeklärt, es werden ihnen aber transaktivierende Wirkung durch Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben (Gerber et al., 1994). Eine Verlängerung der homopolymeren Glutaminregion über eine bestimmte Anzahl von Glutaminresten hinaus führt zu einer neurodegenerativen Krankheit, die sogenannte spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA), auch als Kennedysyndrom bekannt (La Spada et al., 1991). Die DNA-Bindedomäne (DBD) wird durch die beiden Exons B und C codiert (Abb. 1). Sie besteht aus zwei Cystein-reichen Motiven, in denen je ein Zinkmolekül durch je vier Cysteinreste komplexiert wird (Abb. 1). Die DBD ist unter den Steroidhormonrezeptoren sehr gut konserviert, und die Struktur und Interaktion mit der DNA beim Glukokortikoidrezeptor kristallographisch aufgeklärt (Härd et al., 1990, Luisi et al., 1991). Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Androgenrezeptor die gleiche Struktur in der DNA-Bindungsdomäne wie der GR aufweist, und durch die homologen Aminosäuren mit der DNA interagiert. Beim Glukokortikoidrezeptor interagiert der erste Zinkfinger mit der DNA, der zweite stabilisiert einerseits die DNA-Bindung durch Interaktion mit dem Phosphatrückgrat, und andererseits ist er für die Rezeptordimerisierung verantwortlich (Forman und Samuels, 1990, Härd et al., 1990, Luisi et al., 1991, Dahlman-Wright, 1991).

Der an die DBD angrenzende C-terminale Bereich (Aminosäuren 614-670) wird als Gelenkregion (*hinge region*) bezeichnet und beinhaltet das Kernlokalisierungssignal des Androgenrezeptors (Aminosäuren 617-633), welches für den Transport in den Zellkern wichtig ist (Jenster et al., 1992, Zhou et al., 1994).

Proteine, die im Zellkern ihre Funktion ausüben (z.B. Transkriptionsfaktoren) müssen die Kernmembran passieren, um in den Kern zu gelangen. Dies geschieht an bestimmten Stellen der Kernmembran, den Kernporen. In der folgenden Abbildung (Abb. 2) ist der klassische Mechanismus des Kernimports von Proteinen dargestellt.

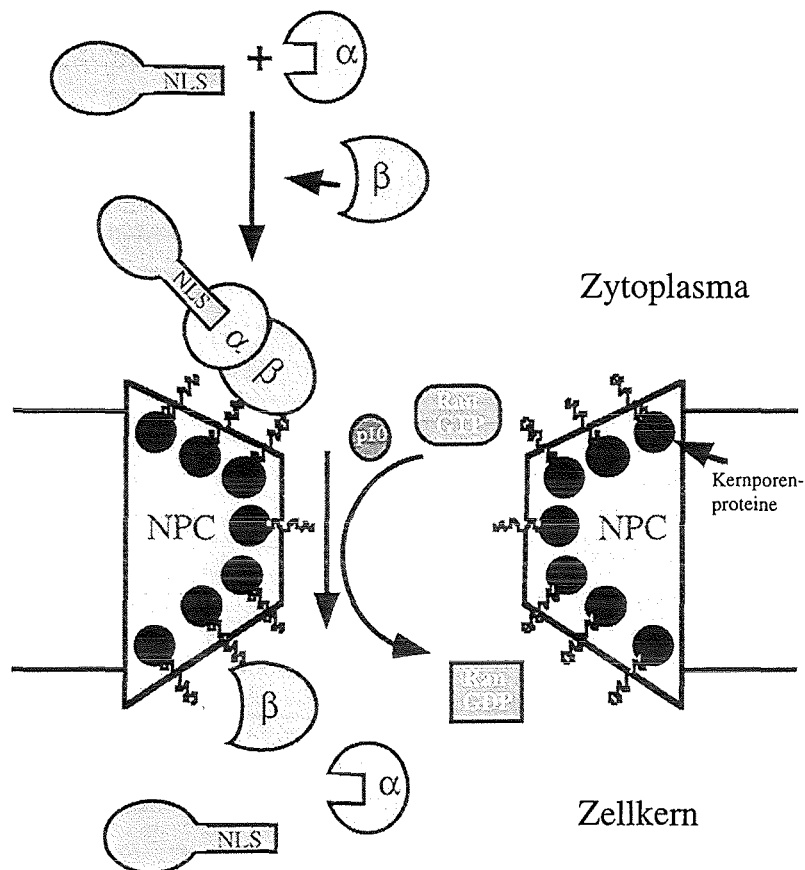


Abb. 2: Modell des klassischen Kerntransports durch die Kernpore. Erklärung im Text. NPC=Kernporenkomplex, NLS=Kernlokalisierungssignal, α u. β sind die NLS-Rezeptoren Importin- α und Importin- β , RanGTP und RanGDP sind Ras verwandte Kernproteine an GTP o. GDP gebunden, p10=Xenopus Homolog des menschlichen NTF2 (Kerntransportfaktor 2).

Der Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC, siehe Abb. 2), der eine Masse von ungefähr 125 Megadalton in höheren Eukaryonten hat, ist aus ca. 100 verschiedenen Polypeptiden aufgebaut (Görlich und Mattaj, 1996). Er besitzt einen durch passive Diffusion passierbaren Kanal mit einem Durchmesser von etwa 10 nm (Adam und Gerace, 1990, Görlich und Mattaj, 1996). Kernproteine, die eine molekulare Masse von 70 Kilodalton überschreiten, können nicht durch passive Diffusion durch die Kernporen diffundieren, sie müssen aktiv in den Kern transportiert werden (Paine et al., 1975, Adam et al., 1990). In diesem Fall kann der Porendurchmesser auf ungefähr 30 nm vergrößert werden (Dworetzky und Feldherr, 1988, Adam und Gerace, 1990). Proteine dieser Größe besitzen Erkennungssequenzen, sogenannte Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS), die von Rezeptoren erkannt werden und daran binden (Adam & Gerace, 1991). Klassische NLS-Rezeptoren sind Importin- α und Importin- β (Weis et al., 1995, Görlich et al., 1995, Abb. 2). Importin- α ist der Rezeptor, für den gezeigt wurde, daß er ein NLS erkennen kann und daran bindet, Importin- β bindet daraufhin an Importin- α und lagert den trimeren Komplex aus NLS-Protein, Importin- α und

Importin- β an Kernporenproteine des NPCs an (Simos und Hurt, 1995, Weis et al., 1996b, siehe Abb. 2). Diese Reaktionen sind energieunabhängig. In mehreren, noch nicht genau verstandenen Schritten, wird das NLS-Protein, unter Beteiligung von Kernporenproteinen und weiteren, am Transport beteiligten Proteinen (p10, Ran, siehe Abb. 3) und unter Energieverbrauch in den Kern transportiert, wo der Komplex dissoziiert und das Kernprotein freigegeben wird (Weis et al., 1996b, Abb. 2). (Zur weiteren Übersicht siehe u. a. , Moore & Blobel, 1992, 1993 u. 1994, Melchior et al., 1993, Powers und Forbes, 1994, Simos und Hurt, 1995, Koepp & Silver, 1996, Görlich et al., 1996b, Pennisi, 1998.)

Obwohl das NLS für den Kerntransport von Steroidhormonrezeptoren wichtig ist, was durch Untersuchungen von NLS-Mutanten gezeigt wurde (Jenster et al., 1993, Jewell et al., 1995, Ylikomi et al., 1992), ist es nicht klar wie der Mechanismus des Kerntransports von Steroidhormonrezeptoren abläuft, und es wurden auch bisher noch keine Interaktionen zwischen NLS-Rezeptoren und Steroidhormonrezeptoren gezeigt.

Eine weitere wichtige Region ist die Hormonbindungsdomäne, die durch die Exons E-H kodiert wird (HBD, Aminosäuren 670-919, Abb. 1). Die Struktur der Androgenrezeptor HBD ist noch nicht aufgeklärt, aber die Kristallstruktur des menschlichen Retinsäurerezeptors (RAR) γ , ein Mitglied der Kernrezeptorfamilie, wurde vor kurzem analysiert (Renaud et al., 1995). Die Struktur der HBD des (RAR) γ besteht aus 11 α -Helixdomänen, die in drei Schichten übereinandergestapelt vorliegen (Fuhrmann et al., 1997). Dieses Modell der HBD dient mittlerweile als Prototyp für alle Mitglieder der Kernrezeptorfamilie (Wurtz et al., 1996).

Die Funktion der HBD des Androgenrezeptors ist die spezifische, hochaffine Bindung von Androgenen (Quigley et al., 1995). In dieser Region befinden sich auch die Bindungsstellen für die inhibitorischen Hitzeschockproteine (Veldscholte et al., 1992a, 1992b). Außerdem wird ihr eine Rolle in der Rezeptordimerisierung zugewiesen. Weiterhin wird vermutet, daß auch sie transaktivierende Aktivität vermittelt (Wong et al., 1993, Jenster et al., 1991).

1.1.3 Wirkung der Androgene

Die lipophilen Androgene sind in der Lage, passiv durch die Zellmembran zu diffundieren. Im Zytoplasma binden sie an den Androgenrezeptor, der durch die Komplexbildung mit Hitzeschockproteinen in einem inaktiven Zustand vorliegt (Abb. 2, Pratt, 1993, Patterson et al., 1994). Durch Hormonbindung wird der Rezeptor in seine aktive Form überführt, wobei der Hitzeschockprotein-AR-Komplex dissoziiert (Abb. 3, Grino et al., 1990). Vorher maskierte funktionelle Domänen des Rezeptors, welche für Kernimport, Dimerisierung und DNA-Bindung notwendig sind, werden vermutlich dadurch freigegeben. Der Rezeptor kann nun in

den Kern gelangen, um seine klassische Funktion, die Regulation von Zielgenen, auszuüben (Quigley et al., 1995).

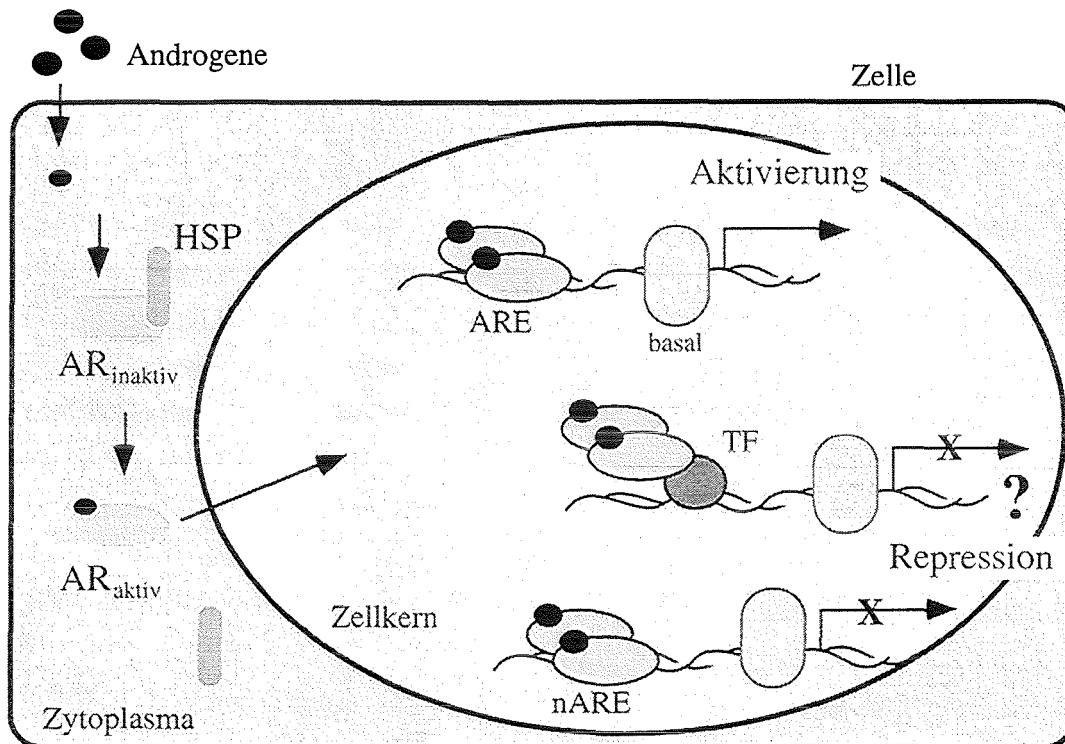


Abb. 3: Der Androgenrezeptor vermittelt aktivierende und reprimierende Wirkungen der Androgene. Schematische Darstellung der klassischen Androgen-vermittelten Wirkung durch den Androgenrezeptor. Die Mechanismen werden im Text erklärt. AR=Androgenrezeptor, HSP=Hitzeschockproteine, ARE=Androgen responsives Element, nARE=negatives ARE, TF=Transkriptionsfaktor, basal=basale Transkriptionsmaschinerie.

Der Androgenrezeptor kann im Zellkern auf positive und negative Weise die Expression von Genen modulieren. Die bestuntersuchte und charakterisierte Funktion ist die der Transaktivierung. Das Rezeptordimer ist in der Lage, spezifische Bindungsstellen in der Promotorregion von Zielgenen zu erkennen, daran zu binden, und diese Gene zu aktivieren (Abb. 3, siehe „Aktivierung“). Eine solche Bindungsstelle stellt das sogenannte Hormon-responsive Element (*hormone response element*, HRE) dar, für das die zweigeteilte Nukleotidsequenz 5'GGTACAnnnTGTTCT 3' kodiert (van der Ahe et al., 1985, Cato et al., 1987, Cato und Weinmann, 1988, Beato, 1989). An das HRE können ebenfalls der GR, PR, und MR binden. Neben dieser Sequenz wurden in verschiedenen androgenen Zielgenen weitere, für den AR zum Teil spezifische, Bindungssequenzen (Androgen responsive Elemente, ARE, Abb. 3) gefunden (zur Übersicht siehe Lindzey et al., 1994, Claessens et al., 1996). Nach Bindung an die DNA kann der Rezeptor mit Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren und die Expression des Gens aktivieren (McEwan und Gustafsson, 1997). Interaktionen mit akzessorischen Proteinen, wie Androgenrezeptor-

assoziiertes Protein (ARA₇₀), Insulin-degradierendes Enzym (IDE, auch *rezeptor accessory factor*, RAF) oder CREB-bindendes Protein (CBP) können die transkriptionelle Aktivität des AR verstärken, wobei diese Koaktivatoren keine eigenen transaktivierenden Effekte besitzen (Kupfer et al., 1993, Yeh und Chang, 1996, Aarnisolo et al., 1998).

Zusätzlich zur transaktivierenden Eigenschaft besitzt der Androgenrezeptor auch eine reprimierende Funktion (Repression der Transkription von Genen), welche auf verschiedene Weise vermittelt werden kann. Der AR kann durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren hemmende Funktion auf diese ausüben. Eine weitere Möglichkeit der negativen Regulation besteht in der Bindung des AR an ein erst kürzlich beschriebenes negatives ARE, wodurch die Reprimierung eines Gens erfolgen kann (Abb. 3).

Hemmung der Transaktivierung durch Interaktion des AR mit Transkriptionsfaktoren wurde von mehreren Forschungsgruppen berichtet. Kallio et al. berichteten eine Hemmung eines durch den Transkriptionsfaktor c-Jun aktivierbaren Reportergens durch Wechselwirkung des AR mit c-Jun ohne direkte Bindung des AR an das AP-1-Element, welches die Bindestelle für das c-Jun-Homodimer markiert (Kallio et al., 1995). Sie zeigten auch, daß für diese Hemmung die N-terminalen Aminosäuren 147-296 des AR benötigt werden, ein Bereich, für den berichtet wurde, daß er für die transaktivierende Funktion des Androgenrezeptors zuständig ist (Aminosäuren 51-211 u. 244-360 bei Jenster et al., 1991, 1-338 bei Simental et al., 1991, 154-167 u. 295-359 bei Chamberlain et al., 1996).

Eine andere Gruppe zeigte, daß durch Interaktion des Androgenrezeptors mit einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B (RelA), die RelA vermittelte Transaktivierung gehemmt wird. Umgekehrt kann die AR-vermittelte Transaktivierung durch RelA reprimiert werden. An der Vermittlung dieser Effekte sind N-terminale Bereiche des AR beteiligt (Palvimo et al., 1996). In einer späteren Veröffentlichung dieser Gruppe wird erklärt, daß Konkurrenz um den Koaktivator CBP, der die Transaktivierungsaktivität von AR und NF κ B verstärken kann, der Grund für die Hemmung der jeweiligen Transaktivierungseigenschaften ist (Aarnisolo et al., 1998). Andererseits wird berichtet, daß durch die Aufrechterhaltung der Menge des NF κ B Inhibitors I κ B α , die Inhibition der NF κ B-vermittelten Transaktivierung erreicht wird (Keller et al., 1996). Eine Interaktion des AR mit dem Transkriptionsfaktor ERM, wodurch dieser in seiner Transaktivierungsaktivität gehemmt wird, wurde von Schneikert et al. beschrieben (Schneikert et al., 1996). Die Autoren zeigten, daß für die Hemmung der Transaktivierung des menschlichen Kollagenase-I-Gens durch den Androgenrezeptor keine DNA-Bindung aber N-terminale Sequenzen des AR benötigt werden.

Die Hemmung durch DNA-Bindung des AR an ein negatives Androgen-responsives Element wurde von Zhang et al. gezeigt. Sie zeigten, daß der Androgenrezeptor durch Bindung an ein negatives HRE im Gen eines Tumorsuppressors (Maspin), dessen Sequenz

(5'GTACTCTGATCTCC3') zur Konsensussequenz des klassischen HRE (5'GGTACAnnnTGTTCT3') nur wenig Homologie besitzt, Transaktivierung dieses Gens hemmt (Zhang et al., 1997). Burgos-Trinidad et al. untersuchten die Hemmung der Expression einer Lyase in der Maus (Maus-P450c17 Gen) durch den AR (Burgos-Trinidad et al., 1997). Sie zeigten, daß für eine Hemmung der Transaktivierung durch den AR, eine intakte DNA-Bindungsdomäne des AR benötigt wird, und daß der AR in DNaseI-*footprint*-Analysen mit einer bestimmten Region im Promotor des Gens interagiert.

Diese Berichte zeigen, daß der Androgenrezeptor in der Lage ist, durch unterschiedliche Mechanismen transaktivierende und transreprimierende Wirkungen von Androgenen zu vermitteln. Verschiedene Koaktivatoren können die transaktivierende Aktivität des Rezeptors verstärken, oder seine hemmende Wirkung auf transaktivierende Faktoren durch Interaktion mit dem AR aufheben. Hemmung durch den Androgenrezeptor scheint durch mindestens zwei Mechanismen zu erfolgen, zum einen durch Interaktion mit transaktivierenden Transkriptionsfaktoren, zum anderen durch Bindung an ein negatives Hormon-responsives Element. N-terminale Bereiche des Androgenrezeptors spielen bei beiden Funktionen eine Rolle und scheinen sich zum Teil zu überschneiden.

Eine Trennung der transaktivierenden und reprimierenden Eigenschaft des Androgenrezeptors und besonders des N-Terminus würde daher zum besseren Verständnis über die Aktivität des Androgenrezeptors beitragen.

1.2 Androgeninsensitivität

Störungen in der Vermittlung der androgenen Wirkung bei genetisch als männlich determinierten Individuen können dazu führen, daß das gonadale Geschlecht nicht in den männlichen Phänotyp umgesetzt wird. Ursachen für Androgenresistenz können in der Biosynthese des testikulären Testosterons (T) oder in einer Störung der Umformung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) durch das Enzym 5 α -Reduktase liegen, worauf hier nicht näher eingegangen wird (Eberle und Klocker, 1993). Eine weitere Ursache betrifft den Androgenrezeptor, der für die Vermittlung der androgenen Wirkung zuständig ist. Mutationen im AR-Gen können verschiedene Funktionen des AR beeinflussen. Häufig wird die Androgenbindung des Rezeptorproteins gestört, Mutationen können aber auch zu Fehlfunktionen der DNA-Bindungsaktivität, der transaktivierenden und transreprimierenden Aktivität des Rezeptors führen (Eberle und Klocker, 1993, Quigley et al., 1995). Je nach schwere der Androgenresistenz treten verschiedene Formen des männlichen Pseudohermaphroditismus (Pseudohermaphroditismus masculinus) auf, die von infertilen

Männern über partielle Virilisierung (Reifensteinsyndrom) bis hin zu phänotypisch weiblichen Individuen (Testikuläre Feminisierung) reichen (Griffin und Wilson, 1989, Quigley et al., 1995). Das Spektrum der Krankheiten wird in zwei Kategorien eingeteilt, partielle und komplette Androgeninsensitivität, welche die Syndrome der männlichen Infertilität und das Reifensteinsyndrom beinhalten (Quigley et al., 1995). (Zur Übersicht siehe u.a. Griffin und Wilson, 1989, McPhaul et al., 1991, Eberle und Klocker, 1993, Quigley et al., 1995, Brinkmann et al., 1996.)

1.2.1 Komplette Androgeninsensitivität

Die schwerwiegendste Form von Pseudohermaphroditismus masculinus ist die komplette Androgeninsensitivität (*complete androgeninsensitivity*, CAI). Sie ist geschlechtsgebunden rezessiv und zeigt den männlichen Karyotyp 46XY. Nach einer dänischen Studie von 1992 liegt die Verbreitung der Krankheit bei etwa 1: 20400 männlicher Geburten (Bangsboll et al., 1992). Patienten mit CAIS zeigen einen weiblichen Phänotyp mit normaler Brustentwicklung und weiblichen äußeren Genitalien, wobei die Axillar- und Schambehaarung (Pubesbehaarung) fehlt. Weitere Kennzeichen sind unterentwickelte Schamlippen (Labien) und eine blind endende Vagina. Ferner sind Hoden im Leistenkanal oder in den Labien zu finden, Wolff'sche und Müller'sche Derivate fehlen. Ferner sind die Plasmaspiegel von Testosteron, Östrogen und Lutenisierungshormon (LH) erhöht (Griffin und Wilson, 1989, Quigley et al., 1995).

Die Defekte im Androgenrezeptor bei Patienten mit kompletter Androgeninsensitivität rangieren von Deletionen im AR-Gen, wodurch kein oder nur Teile des AR-Proteins exprimiert werden, über Punktmutationen, wodurch Stop-Kodons erzeugt werden, die zu deletierten Rezeptoren führen, bis hin zum Austausch von Aminosäuren, die die DNA-Bindung und Androgenbindung beeinflussen (Quigley et al., 1995).

1.2.2 Partielle oder inkomplette Androgeninsensitivität

Die Krankheit ist wie bei CAIS geschlechtsgebunden rezessiv und zeigt den männlichen Karyotyp 46XY. Wegen der Vielfalt der Erscheinungsformen, die auch zum Teil nicht dokumentiert werden, wie im Falle des männlichen Infertilitätssyndroms, ist über die Verbreitung nichts bekannt (Quigley et al., 1995).

Der Phänotyp bei Patienten mit partieller Androgeninsensitivität (PAIS) umfaßt eine große Varietät weniger stark ausgeprägter Virilisierungsdefekte. Sie rangieren von normalen männlichen Phänotypen, wie beim männlichen Infertilitätssyndrom, über Unterentwicklungen der männlichen Erscheinungsform mit verschiedenen Formen von Hodenhochstand

(Kryptorchismus) und Mikropenis, bis hin zum weiblichen Phänotyp, ähnlich wie bei CAIS, jedoch mit normaler Axillar- und Pubesbehaarung. Weiterhin sind Derivate der Wolff'schen Gänge, wie Nebenhoden, Samenleiter und Samenblase, vorhanden, während Derivate von Müller'schen Gängen fehlen. Die Plasmaspiegel von Testosteron, Östrogen und Lutenisierungshormon sind normal, können aber auch erhöht sein (Griffin und Wilson, 1989, Quigley et al., 1995). Androgenrezeptormutationen sind mit denen bei CAIS vergleichbar, außer daß Deletionen nicht, oder sehr selten auftreten. Allgemein sind durch Austausch von Aminosäuren weniger konservierte Bereiche des Rezeptors betroffen (Quigley et al., 1995).

Eine besondere Form von PAIS ist das Reifensteinsyndrom (Reifenstein, 1947). Diese vererbte Form männlichen Pseudohermaphroditismus zeigt, auch innerhalb betroffener Familien, ein breites Spektrum der Erscheinungsformen, bei der die äußeren Geschlechtsorgane überwiegend männlich sind (Quigley et al., 1995). Die klinischen Symptome sind u. a., Kryptorchismus, perineoskrotale Hypospadie (die Harnröhrenmündung liegt zwischen Penis und Skrotum, pubertäre Gynecomastie (Brustvergrößerung) und Mikropenis (Amrhein et al., 1977). Plasmatestosteronspiegel sind normal, die von Östrogen und Lutenisierungshormon erhöht (Griffin und Wilson, 1989).

Mutationen im Androgenrezeptorgen können nicht nur das Endprodukt, das Androgenrezeptorprotein betreffen, sie können auch schon auf transkriptioneller Ebene wirken, indem sie die Stabilität der Boten-RNA (messenger-RNA, mRNA) beeinflussen, was zu einem schnelleren Abbau der mRNA und letztendlich zu verminderten Rezeptorproteinmengen führen kann. Choong et al. beschrieben einen Aminosäureaustausch im C-Terminus des AR, welcher mit einer reduzierten Ligandenbindungsaffinität und mRNA-Menge zusammenhing (Choong et al., 1996a). In einer anderen Veröffentlichung beobachteten Choong et al. eine Relation zwischen der Länge der homopolymeren N-terminalen Glutaminregion und verminderten mRNA-Mengen (Choong et al., 1996b). Marcelli et al. fanden ein Stop-Kodon im AR-Gen bei einem Patienten mit kompletter Androgeninsensitivität, das mit der Synthese eines trunkierten Rezeptors einherging. Sie konnten weiter zeigen, daß durch Einführung dieses Stop-Kodons in die cDNA eines AR-Expressionsvektors, an der Stelle wo sie die Mutation fanden, eine instabile mRNA erzeugt wird, deren Menge in transienten Experimenten reduziert war (Marcelli et al., 1990). In der testikulär feminisierten Maus (*testicular feminized (Tfm) mouse*) führt eine Basendeletion im N-Terminus des Androgenrezeptors zu einer Leserahmenverschiebung, die 42 Aminosäuren später ein Stop-Kodon erzeugt, dies äußert sich in einem trunkierten Androgenrezeptor, dem die DNA- und Hormonbindungsdomäne fehlen (Charest et al., 1991). Bei Untersuchungen der mRNA wurde gefunden, daß diese gegenüber Wildtyp-AR-mRNA-Mengen stark vermindert war (Charest et al., 1991). Diese Berichte lassen vermuten, daß

Mutationen im Androgenrezeptorgen, die einen Einfluß auf transkriptioneller Ebene ausüben, auch zu Androgeninsensitivität führen können.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die Rolle des Androgenhormonrezeptors in der Vermittlung der androgenen Wirkung ist bei der Differenzierung zum männlichen Geschlecht sehr bedeutsam. Charakterisierung von Mutanten des Androgenrezeptors aus Patienten mit Androgenresistenzsyndromen können dazu beitragen, die androgene Signaltransduktion aufzuklären.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch Verwendung zweier Mutanten des AR, bei denen die Mutation in einem Bereich liegt, der für den Kernimport zuständig ist, mehr über den Mechanismus des Kerntransports beim Androgenrezeptor, bzw. bei den Steroidhormonrezeptoren allgemein, zu erfahren.

Der N-Terminus des Androgenrezeptors trägt wesentlich zur Funktion des Rezeptors bei, wobei die Bereiche, die für die transaktivierende und besonders reprimierende und DNA-bindende Aktivität wichtig sind, noch nicht gut beschrieben wurden. Er enthält außerdem drei homopolymere Aminosäureregionen, über deren Funktion noch wenig bekannt ist. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war es deshalb, die Eigenschaften N-terminaler Regionen in Bezug auf Transaktivierung, Repression und DNA-Bindung genauer zu charakterisieren. Im Zusammenhang mit der Arbeit über den N-Terminus des AR wurde eine Mutante des Androgenrezeptors untersucht, die bei einem Patienten mit Reifensteinsyndrom gefunden wurde. Die Mutation ist im N-Terminus lokalisiert, erzeugt aber kein Stop-Kodon, was ein trunkiertes Rezeptorprotein zur Folge hätte. Es war deshalb interessant, die Ursache für die Anomalie des Patienten zu untersuchen und möglicherweise dadurch auch mehr über die Funktion des N-Terminus des Androgenrezeptors zu erfahren.

2 Ergebnisse

2.1 Ergebnisse 1. Teil: Untersuchung von zwei Mutanten des menschlichen Androgenrezeptors aus Patienten mit kompletter Androgeninsensitivität

Störungen der Androgenwirkung führen dazu, daß das männliche gonadale Geschlecht nicht oder nur teilweise in den männlichen Phänotyp umgesetzt wird. Die schlimmsten Formen einer Androgenresistenz faßt man unter „komplette Androgeninsensitivitätssyndromen“ (*complete androgen insensitivity syndrom*, CAIS) zusammen (Patterson et al., 1994, Quigley et al., 1995). Patienten mit solch einer kompletten Form der Androgenresistenz haben einen weiblichen äußeren Phänotyp, innere weibliche Genitalien sind aber nicht oder nur rudimentär vorhanden (Quigley et al., 1995). Häufig sind Störungen in der Androgenwirkung die Ursache für solche Androgenresistenzen und werden oft durch Mutationen im Androgenrezeptorgen hervorgerufen.

Durch Charakterisierung des Androgenrezeptors (AR) aus verschiedenen Patienten mit kompletten Androgeninsensitivitätssyndromen wurden von unterschiedlichen Forschergruppen zwei Mutationen entdeckt, welche beide jeweils zu einem Aminosäureaustausch in der Nähe des zweiten Zinkfingers der DNA-Bindedomäne führen. Die eine ersetzt Arginin zu Histidin an Position 615 (AR-R615H, Brown et al., 1993, Mowszowicz et al., 1993, Beitel et al., 1994 und Ris-Stalpers et al., 1994). In Hormonbindungsanalysen mit dieser Mutante konnte keine veränderte spezifische Androgenbindungsaktivität festgestellt werden; in transienten Transaktivierungsanalysen war jedoch keine Aktivität meßbar; weiterhin wurde gezeigt, daß die DNA-Bindungsaktivität dieser Mutante im transienten System gestört ist (Mowszowicz et al., 1993, Beitel et al., 1994). Untersuchungen der mRNA Menge aus primären Genitalhautfibroblasten des Patienten mit dem mutierten Rezeptor AR-R615H zeigten darüberhinaus, daß diese stark vermindert war (Mowszowicz et al., 1993, Beitel et al., 1994). Die andere Mutation erzeugt einen Austausch von Arginin zu Prolin an Position 617 (AR-R617P, Marcelli et al., 1991). Zoppi et al. haben die Mutation AR-R617P, zusammen mit einer weiteren Mutation (S597G) in der Dimerisierungsbox (D-Box) des AR (AA-Position 596-600, Dahlman-Wright et al., 1991), in einem Patienten mit partieller Androgeninsensitivität gefunden und untersucht (Zoppi et al., 1992). Die einzelne Mutation R617P zeigt die gleichen Eigenschaften wie die Mutation an Position 615; die Androgenbindungsaktivität war nicht verändert; es konnte keine transaktivierende Aktivität festgestellt werden; und die DNA-Bindungsaktivität war gestört (Marcelli et al., 1991, Zoppi et al., 1992). Die zusätzliche Mutation

S597G, die von Zoppi et al. im gleichen Patienten gefunden wurde, ist in der Lage, die fehlende DNA-Bindungsaktivität des mutierten Rezeptors AR-R617P teilweise wieder herzustellen, nicht jedoch den Transaktivierungsverlust (Zoppi et al., 1992). Da die basischen Aminosäuren des zweiten Zinkfingers die Rezeptor-DNA Interaktion durch Kontakt mit dem Phosphatrückgrat der DNA stabilisieren, und dort außerdem auch die D-Box lokalisiert ist, welche für die Rezeptordimerisierung notwendig ist (Luisi et al., 1991, Gast et al., 1995), kamen die Autoren zu dem Schluß, daß die verminderte DNA-Bindungsaktivität der Mutanten der Grund für komplette Androgeninsensitivität sei. Die Aminosäurenaustausche liegen aber nicht nur in der Nähe der DNA-Bindungsdomäne, sondern auch in der Nähe oder direkt in der Sequenz des Kernlokalisationssignals des Androgenrezeptors (AA-Position 617-633, Jenster et al., 1992, Jenster et al., 1993, Lindzey et al., 1994). Dies läßt vermuten, daß die gestörte DNA-Bindungsaktivität dieser Rezeptormutanten lediglich ein Seiteneffekt ist, und daß der wahre Grund für Androgeninsensitivität woanders zu suchen ist. Es wäre möglich, daß der Kerntransport der Mutanten-AR gestört ist. Dieser ist jedoch eine Voraussetzung sowohl für die Bindung an DNA und die Regulation der Genexpression.

Um die intrazelluläre Lokalisation und den Kernimport dieser Androgenrezeptormutanten näher zu untersuchen, wurden Immunofluoreszenz- und Kernimportanalysen (*in vitro nuclear import assays*) durchgeführt und die Interaktion zwischen Rezeptor und Kernimportproteinen untersucht. Die mutierten Rezeptoren aus den Patienten mit CAIS wurden in den Expressionsvektor pSG-5 rekonstruiert und damit unter die Kontrolle des SV40 Promotors gebracht. Die Expressionsplasmide für beide Mutanten AR-R615H und AR-R617P wurden von Dr. H. Klocker (Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Ein Aminosäurenaustausch von Arginin zu Histidin an Position 615, nicht aber Arginin zu Prolin an Position 617 im Androgenrezeptor, verhindert DNA-Bindung

Bevor die Kernlokalisierung des Androgenrezeptors und der beiden Mutanten AR-R615H und AR-R617P untersucht werden sollte, wurden die Expressionsplasmide auf ihre Funktionalität und Proteinproduktion überprüft. Dazu wurden DNA-Bindungs- und Immunoblotanalysen durchgeführt. Cos-7 Zellen wurden mit leerem Expressionsvektor, Wildtyp-AR und den beiden Mutanten AR-R615H und AR-R617P durch Elektroporation transient transfiziert und mit Dihydrotestosteron (DHT) oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) als Kontrolle transaktiviert. Mit Gesamtzellextrakten aus diesen Zellen wurden dann Gelretardationsanalysen und Immunoblots durchgeführt.

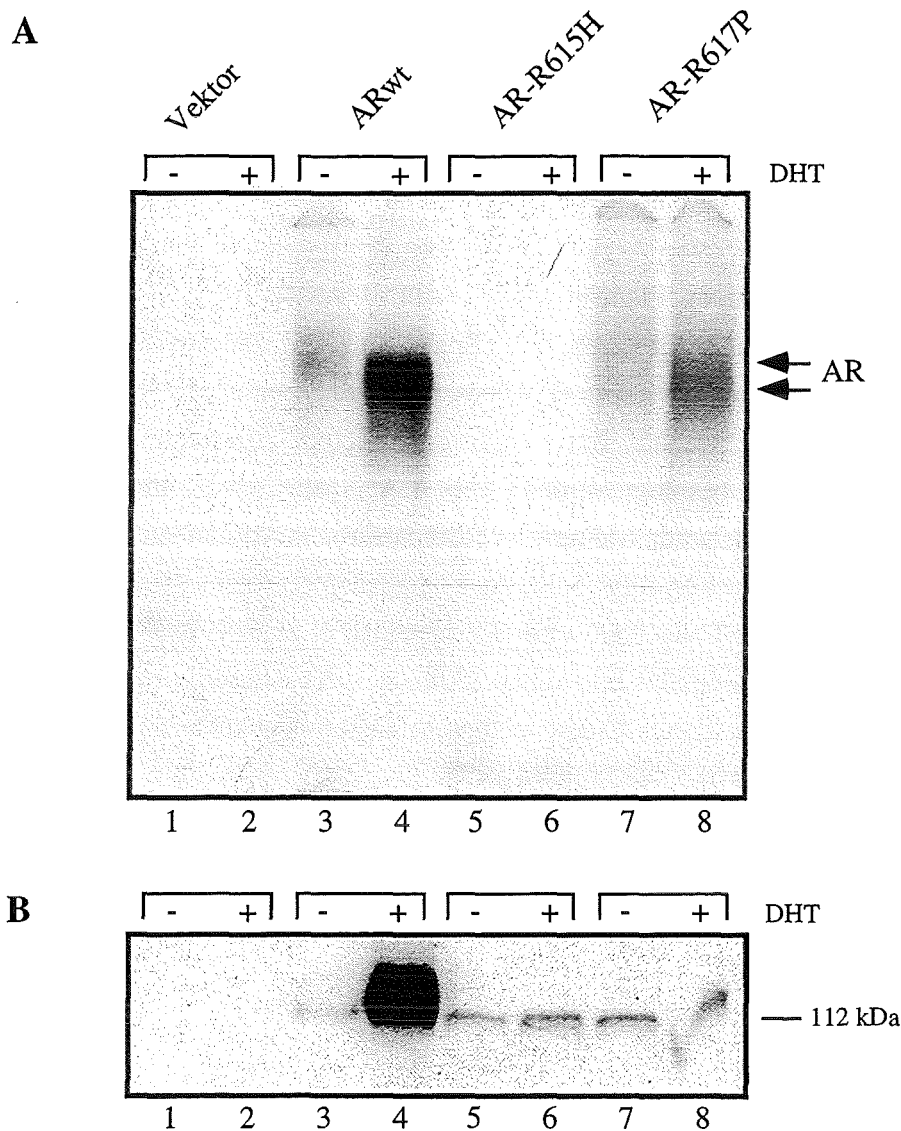


Abb. 4: Gelretardationsexperiment mit Wildtyp AR, der AR-R615H und der AR-R617P Mutante des AR. A) Je 15 µg leerer Expressionsvektor, Expressionsvektor mit Wildtyp-AR, der AR-R615H oder der AR-R617P-Mutante wurden mittels Elektroporation in Cos-7 Zellen transfiziert und mit Androgen (DHT, Endkonzentration 10^{-7} M) oder der gleichen Menge Lösungsmittel (80% Äthanol) behandelt. 20 µg eines Gesamtzellextraktes der Zellen wurden zuerst 10 min. mit 1 µg poly(dI/dC) auf Eis, dann 20 min. mit radioaktiv markiertem ARE-Oligonukleotid (10.000cpm, 2fmol) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Pfeile zeigen AR-DNA-Komplexe, die mit und ohne Hormon unterschiedliches Laufverhalten zeigten. B) Immunoblot mit 20 µg des Gesamtzellextraktes der Cos-7 Zellen aus A. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Anschließend wurde die Membran mit dem Anti-AR Antikörper SPO61 (Epitop AS 301-320, van Laar et al., 1989) und danach mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert und mit Hilfe einer Nachweisreagenz (Amersham) detektiert. Die Größe des AR ist angegeben.

Extrakte aus leervektortransfizierten Zellen, in denen kein Androgenrezeptorprotein vorhanden ist (Abb. 4 B, Spalte 1 u. 2), zeigten nur unspezifische DNA-Bindung (Abb. 4 A, Spalte 1 u. 2). Proteinextrakte aus Zellen, in denen der Wildtyp-Androgenrezeptor exprimiert wurde, zeigten ohne und mit Hormon DNA-Bindungskomplexe (Abb. 4 A, Spur 3 u. 4, Pfeile). Es ist

deutlich zu erkennen, daß durch die Zugabe von DHT eine Veränderung im Laufverhalten des Protein-DNA-Komplexes auftritt (oberer Pfeil ohne DHT, unterer Pfeil mit DHT). Über die Bindung von Hormon an Steroidhormonrezeptoren wurde berichtet, daß dies zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt (Allan et al., 1992).

Wie in der Literatur beschrieben (Beitel et al., 1994), verhindert die Mutation an Aminosäureposition 615 von Arginin zu Histidin die Interaktion des Androgenrezeptors mit einem Androgenresponsiven Element (ARE) (Abb 4 A, Spalte 5 u. 6), obwohl genügend Rezeptorprotein gebildet wurde (Abb. 4 B, Spalte 5 u. 6). Die zweite Mutante, AR-R617P, verhielt sich nicht so wie von Zoppi et al. beschrieben (Zoppi et al., 1992). Daß die Mutation die DNA-Bindungseigenschaft des Androgenrezeptors beeinträchtigt, beziehungsweise verhindert, konnte nicht bestätigt werden (Abb. 4 A, Spalte 7 u. 8, Pfeile). Auch hier war im Gesamtzellextrakt ausreichende Mengen an Rezeptorprotein vorhanden (Abb. 4B, Spalte 7 u. 8). Die Bindung von Hormon führt beim Androgenrezeptorprotein dazu, daß dieses stabilisiert wird und nicht so schnell abgebaut wird (Kemppainen et al., 1992, Zhou et al., 1995). Dies kann man auch im Immunoblot erkennen (Abb. 4, vergleiche die Spuren 3 u. 4). Bei den mutierten Rezeptoren ist dieser Effekt in diesem Experiment nicht zu erkennen. Der Grund dafür ist nicht zu erklären.

Dieses Ergebnis stützt die von Beitel et al. erhaltenen Befunde, daß bei der AR-R615H-Mutante die verlorene DNA-Bindungsaktivität der Grund für die Androgeninsensitivität in diesen Patienten zu sein scheint. Da der Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin an Position 617 jedoch die DNA-Bindungseigenschaft des Androgenrezeptors nicht zu beeinflussen scheint, muß es eine andere Erklärung geben, die für die fehlende transaktivierende Eigenschaft und schließlich auch die komplette Androgeninsensitivität, die diese Mutation in dem betroffenen Patienten hervorrief, verantwortlich ist.

Um die Eigenschaften des Androgenrezeptors und der Mutanten AR-R617P, bezüglich ihrer Kernimporteigenschaften zu testen, wurden Immunofluoreszenzuntersuchungen durchgeführt, die die Lokalisierung der Rezeptorproteine ohne und in Gegenwart von Hormon zeigen. Die Mutante AR-R615H wurde als Kontrolle verwendet.

2.1.2 Zelluläre Lokalisierung des Androgenrezeptors und der Mutanten AR-R615H und AR-R617P

Der Androgenrezeptor ist, wie alle Steroidhormonrezeptoren, im Zytoplasma mit mehreren Hitzeschockproteinen (Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56) assoziiert, wodurch er in einer inaktiven Form gehalten wird (Veldscholte et al., 1992, Smith und Toft, 1993). Durch die Bindung mit Hormon (DHT) wird dieser in eine aktive Form transformiert, wobei die Hitzeschockproteine

vom Rezeptor dissoziieren, und vorher maskierte funktionelle Domänen des Rezeptors freigeben, welche für Kernimport, Dimerisierung und DNA-Bindung notwendig sind (Quigley et al., 1995). Der aktive Rezeptor wird schließlich in den Kern transportiert.

Cos-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für die Rezeptoren durch Elektroporation transient transfiziert und auf Glasplättchen ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit oder ohne DHT für 4 h inkubiert und fixiert. Nach der Fluoreszenzfärbung mit spezifischen Erst- und Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Zweitantikörpern, wurde zusätzlich eine Kernfärbung mit Bis-Benzimid durchgeführt. Die Objekte wurden dann im Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert.

Die nachfolgenden Fotos (siehe Seite 18) sind so angeordnet, daß man auf der linken Seite die Kernfärbung erkennen kann (Blau), wodurch die Position der Kerne bestimmt werden kann. Auf der rechten Seite erkennt man die spezifische Anfärbung des Androgenrezeptorproteins in den Zellen (Rot).

Ohne Ligand ist der Wildtyp-Androgenrezeptor im Zytoplasma (Abb. 5 A, rechts oben). Durch die Hormonbindung des Rezeptors wird er in den Kern transportiert (Abb. 5 A, rechts unten). Auch der mutierte Androgenrezeptor AR-R615H ist ohne Hormonbehandlung im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 5 B, rechts oben). Obwohl er jedoch eine normale Androgenbindung aufweist (Beitel et al., 1994), ist nach Hormongabe keine Kernlokalisierung nachzuweisen (Abb. 5 B, rechts unten). Wie im Falle des Wildtyp-Androgenrezeptors und der AR-R615H Mutante ist die Mutante AR-R617P ohne Ligand im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 5 C, rechts oben). Auch hier wird das hormonbehandelte, mutierte Rezeptorprotein nicht in den Kern transportiert (Abb. 5 C, rechts unten). Diese Beobachtung ist insofern überraschend, da der Rezeptor trotz Mutation noch in der Lage ist, DNA zu binden, was darauf hinweist, daß eine eventuelle Konsequenz der Mutation zwar den Kernimport, nicht aber die DNA-Bindungsaktivität beeinflusst. Diese Befunde weisen darauf hin, daß die Aminosäureaustausche R615H und R617P, die in der Nähe beziehungsweise im Kernlokalisierungssignals des Androgenrezeptors liegen, dafür verantwortlich sind, daß diese Androgenrezeptormutanten nicht mehr in den Kern transportiert werden können.

Was ist aber der Grund dafür, daß diese Mutanten nicht mehr in den Kern transportiert werden können. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Methode gewählt mit der die einzelnen Schritte beim Kerntransport von Proteinen besser untersucht werden können (*in vitro nuclear import assays*).

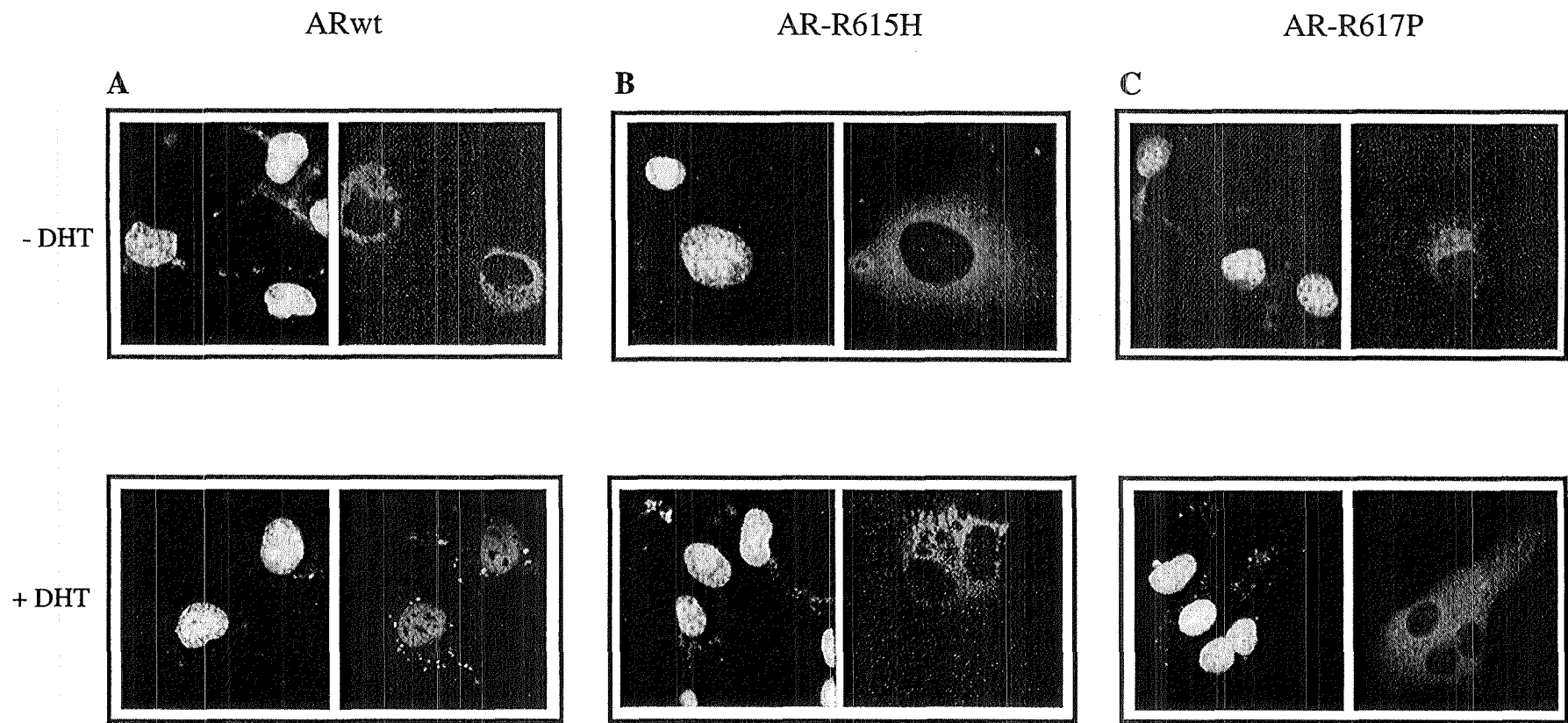


Abb. 5 A, B, C: Immunofluoreszenzfärbung von Wildtyp-AR, AR-R615H und AR-R617P in transient transfizierten Cos-7 Zellen. Je 15 µg Expressionsvektor mit Wildtyp-AR, AR-R615H und AR-R617P wurden durch Elektroporation in Cos-7 Zellen transfiziert und in 10 cm Petrischalen ausgesät, die mit Glasplättchen bestückt waren. Nach 48 h wurde für 4 h mit DHT (107 M) oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) inkubiert. Nach waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, und dann 1 h mit dem AR-spezifischen Antikörper F 39.4.1 inkubiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit TRITC-markiertem Zweitantikörper. Vor den letzten Waschungen wurde noch Bis-Benzimid (Kernfärbung) für 5 min zugegeben.

2.1.3 Die Mutationen R615H und R617P hemmen den Kerntransport von AR-NLS-Fusionsproteinen *in vitro*

Proteine, die eine molekulare Masse von bis zu 30 Kilodalton (kDa) nicht überschreiten, können den Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) durch passive Diffusion passieren, um in den Kern gelangen. Proteine die größer sind als 30-40 kDa müssen aktiv in den Kern transportiert werden (Adam et al., 1990). Dafür besitzen die meisten Kernproteine Erkennungssequenzen, sogenannte Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS), welche von NLS-Rezeptoren (Importin- α , Importin- β , Transportin) erkannt werden (Adam & Gerace, 1991, Weis et al., 1995, Görlich et al., 1995, Pollard et al., 1996). Diese transportieren die Kernproteine in einem mehrere Schritte umfassenden Transportprozess durch die Kernporen in den Zellkern (Weis et al., 1996b, Görlich et al., 1996b).

Für die Erkennung von Kernlokalisationssequenzen, wie sie der Androgenrezeptor aufweist, ist nach dem klassischen Modell Importin- α zuständig, Importin- β bindet an den Importin- α /NLS-Protein-Komplex, und der, aus dann drei Komponenten bestehende Komplex, heftet sich an Kernporenproteine der Kernmembran. Beim anschließenden Transport durch den Porenkomplex sind weitere Proteine beteiligt, wie zum Beispiel die GTPase Ran und p10 (zur Übersicht siehe Koepp & Silver, 1996, Moore & Blobel, 1993 u. 1994, Melchior et al., 1993). Der Mechanismus des zweiten Schrittes, bei dem Energie in Form von GTP verbraucht wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, daß er über mehrere Stationen von Kernporenproteinen abläuft (Weis et al., 1996b). Im Zytoplasma angekommen, dissoziiert der Komplex, das NLS-Protein wird frei und kann nun seine Aufgabe erfüllen (Görlich et al., 1996b).

Um zu untersuchen, ob das NLS des Androgenrezeptors ausreicht, um Kerntransport zu vermitteln, und ob die Mutationen R615H und R617P der alleinige Grund für die Hemmung des Kerntransports sind, wurden *in vitro* Kernimportanalysen durchgeführt. Dazu wurde eine Sequenz des Androgenrezeptors (beziehungsweise der Mutanten), die das NLS beinhaltet (Aminosäuren 578-667 vom AR), mit β -Galaktosidase fusioniert und bakteriell exprimiert. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mit permeabilisierten HeLa Zellen (zytoplasmaentleert), Extrakten von *Xenopus* Eiern (enthalten *Xenopus* Kerntransportfaktoren) und ohne oder mit einem energieregenerierenden System (ist für den eigentlichen Transport durch die Kernpore notwendig) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Fusionsproteine mit spezifischen Erst-Antikörpern gegen β -Galaktosidase (β -Gal) und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweit-Antikörpern detektiert und mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes analysiert und photographiert.

Die nachfolgenden Fotos sind so angeordnet, daß auf der linken Seite Fotos von *import assays* ohne, auf der rechten Seite mit energieregenerierendem System zu sehen sind. Ohne

energieregulierendem System können die Transportfaktoren zwar an das NLS eines zu transportierenden Proteins binden und es an die Kernmembran anlagern, für den Transport durch die Kernpore in den Zellkern ist jedoch Energie nötig (Weis et al., 1996b).

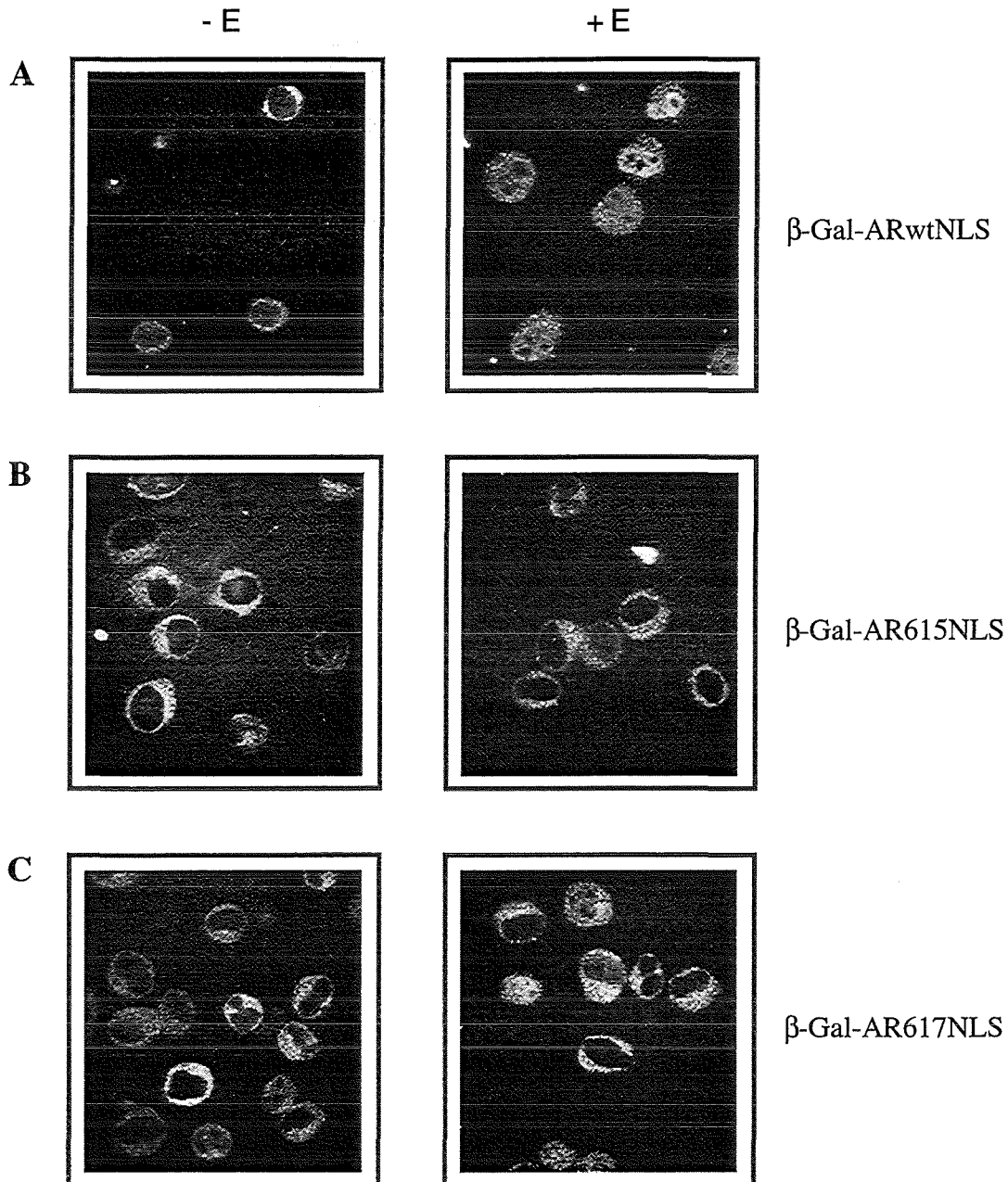


Abb. 6: In vitro Kernimportanalyse der NLS-Fusionsproteine β-Gal-ARwtNLS, β-Gal-AR615NLS und β-Gal-AR617NLS. A), B), C) Je zwei μg Fusionsprotein wurde in einem Volumen von 12 μl mit Transportpuffer (TB), permeabilisierten HeLa-Zellen, *Xenopus egg* Extrakt und einem energieregenerierenden System für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde mit eiskaltem TB abgestoppt, mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellen durch ein Saccharosekissen auf Glasplättchen zentrifugiert. Nach mehreren Waschungen mit PBS-Tween-20 (0,5%) wurde 1 h mit Anti-β-Gal-Antikörper und danach mit einem FITC-markierten Zweitantikörper inkubiert. Nach den anschließenden Waschungen wurden die Glasplättchen mit Einschlußmedium auf Objektträger plaziert mit einem konfokalen Mikroskop untersucht.

Es ist deutlich zu erkennen, daß das β -Gal-Fusionsprotein mit dem Wildtyp-AR-NLS ohne energieregenerierendes System nicht im Zellkern auftritt, sondern sich hauptsächlich um die Kernmembran anlagert (Abb. 6 A, links). Wenn das energieregenerierende System vorhanden ist, dann kann das Fusionsprotein in den Kern transportiert werden (Abb. 6 A, rechts). Das NLS des Androgenrezeptors ist also für den Kerntransport des β -Gal-ARwt-NLS-Fusionsproteins ausreichend.

Die Abbildungen 6 B und 6 C zeigen deutlich, daß die Fusionsproteine mit den mutierten NLS weder in Abwesenheit (links), noch in Anwesenheit (rechts) des energieregenerierenden Systems im Zellkern lokalisiert sind. Das Fluoreszenzsignal ist in beiden Fällen nur an der Kernmembran zu erkennen. Beide Mutationen hemmen somit den Kernimport auch *in vitro*.

Die Mutationen an Aminosäureposition 615 und 617 im Androgenrezeptor hemmen nicht nur *in vivo* den Transport in den Zellkern, sie sind auch ausreichend, um ein Fusionsprotein *in vitro* vor dem Transport in den Kern zu bewahren. Es ist daher anzunehmen, daß sie der alleinige Grund für die Hemmung des Kerntransports sind.

Aus diesen Ergebnissen ist nicht zu ersehen, welcher Schritt des Kernimports durch die Mutationen beeinflusst wird, der erste, die Bindung an die NLS-Rezeptoren oder der zweite Schritt, der Transport durch die Kernpore. Um die beiden Möglichkeiten zu unterscheiden wurde zuerst der erste Schritt (Bindung an die NLS-Rezeptoren Importin- α und Importin- β) untersucht.

2.1.4 Importin- α und Importin- β erkennen das NLS vom menschlichen Androgenrezeptor und dessen NLS-Mutanten AR-R615H und AR-R617P

Der erste Schritt des Transports von Proteinen mit einem klassischen NLS (z.B. Androgenrezeptor) in den Kern ist ein energieunabhängiger Schritt, bei dem die Kerntransportproteine (Importin- α und Importin- β) das Kernlokalisierungssignal erkennen und an den Kernporenkomplex binden; im zweiten, energieabhängigen Schritt, wird das Substrat durch die Kernpore transportiert (Weis et al., 1996a u. b). Von Importin- α ist bekannt, daß es eine Sequenz aus basischen Aminosäuren vom SV40 large T-antigen (PKKKRKV, Kalderon et al., 1984), oder eine zweigeteilte NLS-Sequenz (*bipartite site*) vom Nukleoplasmin (ein Histon bindendes Protein, KRPAATKKAGGAKKKKI, Howe et al., 1998, Robbins et al., 1991) erkennen kann. Das NLS des Androgenrezeptors besteht aus einer zweigeteilten Sequenz aus basischen Aminosäuren bei Position 617-633 (RKCYEAGMTLGARKLKKL, Jenster et

al., 1992), die dem vom Nukleoplasmin ähnelt, und sollte deshalb auch vom Importin- α erkannt werden.

Um den ersten Schritt des Kerntransports, die Interaktion mit den Importfaktoren Importin- α und Importin- β , zu untersuchen, wurden Protein-Protein-Interaktionsexperimente (*pull down assays*) mit Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen durchgeführt. Dazu wurden die Fusionsproteine GST, GST-Importin- α und GST-Importin- β in *E. coli* exprimiert und gereinigt. An Glutathion-Agarose (Serva) immobilisiert wurden sie sodann mit *in vitro* exprimierten und radioaktiv markierten Fusionsproteinen β -Gal-AR-wtNLS, β -Gal-AR-615NLS, β -Gal-AR-617NLS und β -Gal-SV40NLS (NLS vom SV40 T-Antigen) als Kontrolle inkubiert. Nach mehreren Waschungen wurden die Proteine durch Aufkochen mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert.

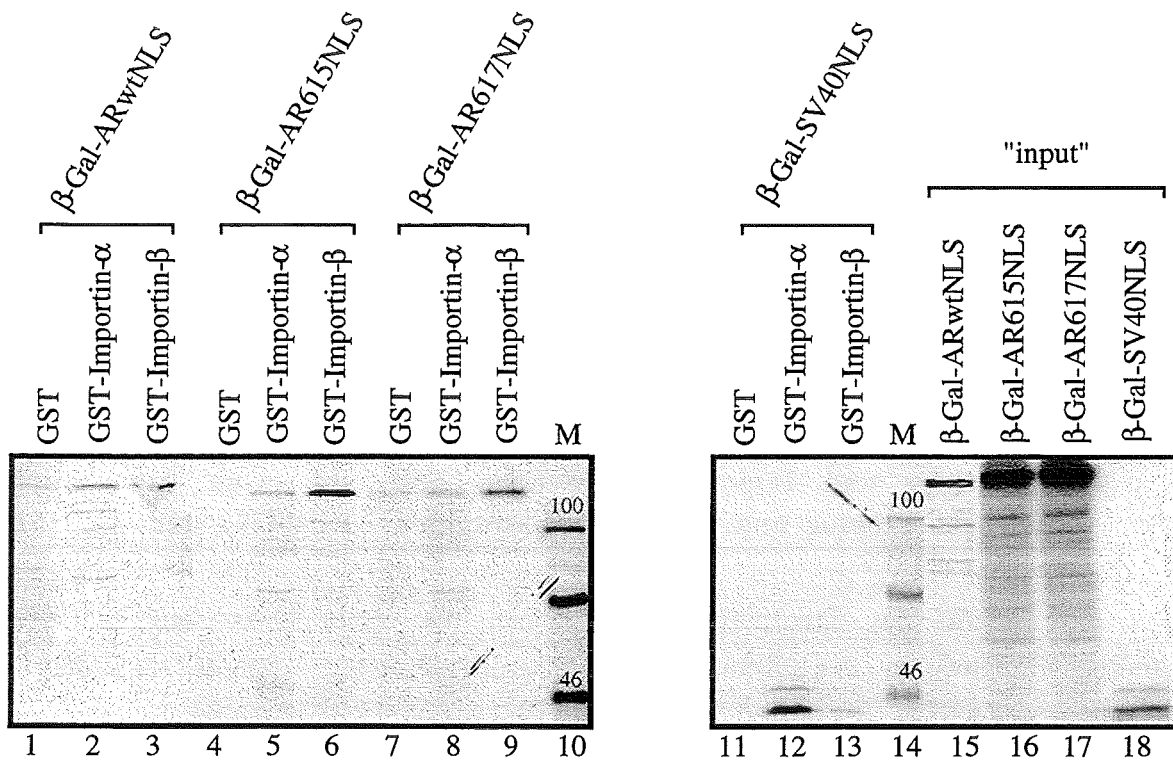


Abb. 7: Importin- α und Importin- β erkennen das NLS des Androgenrezeptors und dessen NLS-Mutanten. GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit GST, GST-Importin- α und GST-Importin- β und *in vitro* translatierten β -GAL-AR-wtNLS, β -GAL-AR-615NLS, β -GAL-AR-617NLS und β -Gal-SV40NLS. Je 20 μ g bakteriell exprimiertes GST, bzw. GST-Importin- α und GST-Importin- β Fusionsproteine wurden an 20 μ l (1:1 in PBS) Glutathion-Agarose gekoppelt und mit je 10 μ l *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem NLS-Fusionsproteinen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 15-18, „input“ wurde jeweils 3 μ l des im Test eingesetzten *in vitro* translatierten Proteins aufgetrennt. In Spur 10 u. 14 wurde radioaktiv markierter Molekulargewicht-Standard aufgetragen.

GST allein interagiert nur sehr schwach mit den NLS-Fusionsproteinen (Abb. 7, Spuren 1,4,7 und 11). Wie zu erwarten war, zeigt GST-Importin- α mit dem NLS-Fusionsprotein des Wildtyp-AR eine Interaktion (Abb. 7, Spur 2). GST-Importin- β interagiert auch in Abwesenheit von Importin- α mit dem Wildtyp-AR-NLS-Fusionsprotein (Abb. 7, Spur 3, Die etwas verschmierte Spur kommt wahrscheinlich vom Trocknungsvorgang, zeigt aber dennoch die Interaktion). Nach dem klassischen Modell interagiert Importin- β nur über Importin- α mit NLS-Proteinen. Auch die im NLS mutierten Fusionsproteine werden von beiden Importfaktoren gebunden (Abb. 7, Spuren 5,6 und 8,9). Es ist auch deutlich zu erkennen, daß die Interaktionen mit GST-Importin- β sogar stärker zu sein scheinen als mit GST-Importin- α (Abb. 7, vergleiche jeweils die Spuren 2 mit 3, 5 mit 6 u. 8 mit 9). Die Kontrolle mit β -GAL-SV40NLS, welches nur mit Importin- α , nicht aber mit Importin- β interagiert, zeigt, daß die Bindung von Importin- β an die AR-Fusionsproteine spezifisch ist (Abb. 7, vergleiche Spur 12 mit 13). Die beiden Mutationen im NLS des Androgenrezeptors scheinen die Interaktion mit Importin- α bzw. Importin- β nicht zu hemmen.

Daß Importin- β das NLS des Androgenrezeptors zu erkennen scheint, und an die Fusionsproteine bindet, war nicht erwartet. Es besteht die Möglichkeit, daß das NLS im Kontext mit dem Fusionsprotein eine andere Struktur aufweist, die die Bindung an Importin- β ermöglicht.

Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurde das gleiche Experiment mit vollständigem radioaktiv markierten Rezeptorproteinen durchgeführt.

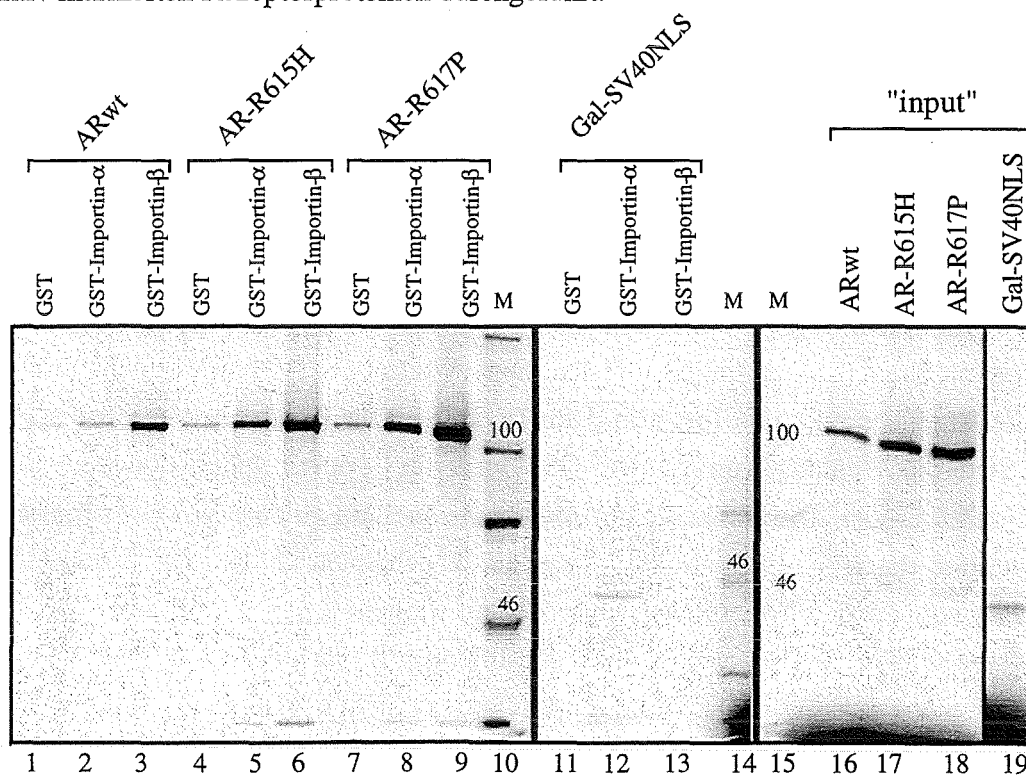


Abb. 8: Beide Kerntransportfaktoren, Importin- α und Importin- β binden sowohl an Wildtyp-AR als auch an die NLS-Mutanten des Androgenrezeptors.

GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit GST, GST-Importin- α und GST-Importin- β und *in vitro* translatierten ARwt, AR-R615H, AR-R617P und β -Gal-SV40NLS. Je 20 μ g bakteriell exprimiertes GST, bzw. GST-Importin- α und GST-Importin- β Fusionsproteine wurden an 20 μ l (1:1 in PBS) Glutathion-Agarose gekoppelt und mit je 10 μ l *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem und hormonaktiviertem ARwt bzw. den angegebenen mutierten AR (mAR), und Gal-SV40NLS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 14-17, „input“ wurde jeweils 3 μ l des im Test eingesetzten *in vitro* translatierten Proteins aufgetrennt. In Spur 10 u. 14 wurde radioaktiv markierter Molekulargewicht-Standard aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Interaktion zwischen GST-Importin- α bzw. GST-Importin- β und dem Wildtyp-AR stattfindet (Abb. 8, Spur 2 u. 3). Auch die beiden mutierten AR werden von den Kerntransportfaktoren gebunden. Weder ein Aminosäureaustausch an Position 615 von Arginin zu Histidin, noch an Position 617 von Arginin zu Prolin konnte die Interaktionen verhindern (Abb. 8, Spuren 5, 6 und 8, 9). Mit GST allein gibt es in allen drei Fällen nur eine geringfügige Bindung, die wahrscheinlich von einer unspezifischen Interaktion der AR mit GST herrühren (Abb. 8, Spuren 1, 4 u. 7). Auch in diesem Experiment ist das Signal, das die Interaktion mit GST-Importin- β widerspiegelt, stärker als bei GST-Importin- α (Abb. 8, vergleiche jeweils die Spuren 2 mit 3, 5 mit 6 u. 8 mit 9). Das etwas andere Laufverhalten der Androgenrezeptoren in den Spalten 3, 6 u. 9 kommt von der Anwesenheit des etwa gleich großen GST-Importin- β (ca. 97 kDa, siehe Abb. 9, vergleiche Spur 8 mit 9), das das Laufverhalten des Rezeptorproteins stört.

Dieses Experiment zeigt, daß beide Importfaktoren, Importin- α und Importin- β , *in vitro* translatierten ARwt und dessen Mutanten AR-R615H und AR-R617P zu binden vermögen. Die Mutationen scheinen auch hier keinen Einfluß auf die Interaktion mit den Kerntransportfaktoren zu haben.

Um die Spezifität der Bindung zwischen Importin- β und den Androgenrezeptoren zu zeigen, wurde im nächsten Experiment versucht, diese Interaktion mit Importin- α zu kompetitieren. Importin- α bindet mit einer basischen N-terminalen Domäne (*importin beta binding domain* (IBB), Görlich et al., 1996a) an Importin- β , welche die Eigenschaften eines NLS aufweist bzw. sich mit dem NLS von Importin- α überlappt (Weis et al., 1996a, Moroianu et al., 1996). Wenn die Bindungsstelle von Importin- β für Importin- α die gleiche ist wie für den AR, dann müßte man die Bindung von AR zu GST-Importin- β durch Inkubation mit Importin- α kompetitieren können. Die Bindung vom AR könnte auch durch eine Konformationsänderung, hervorgerufen durch die Inkubation mit Importin- α , gehemmt werden. Die Bindung zu GST-Importin- α sollte dadurch allerdings nicht gehemmt werden.

Dazu wurde GST, GST-Importin- α und GST-Importin- β , vor der Inkubation mit den *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Rezeptoren, mit nicht radioaktivem Importin- α versetzt. Importin- α , ohne GST, wurde durch Abspaltung des GST mit Thrombin erhalten (siehe 4.21).

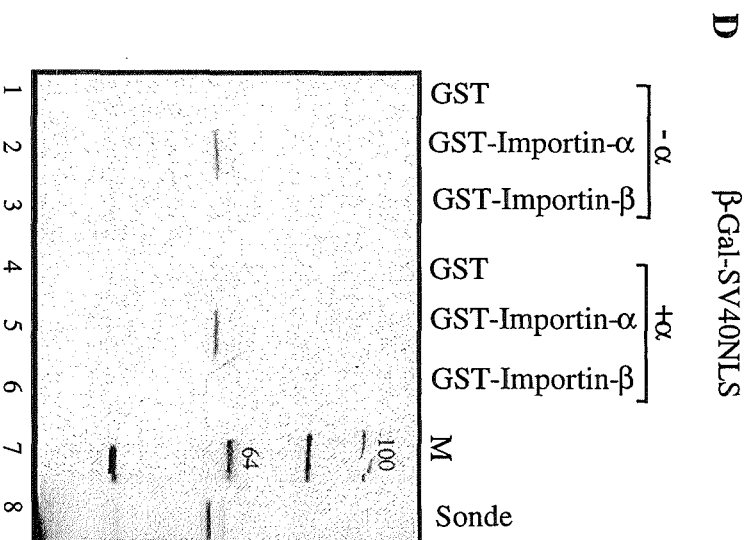
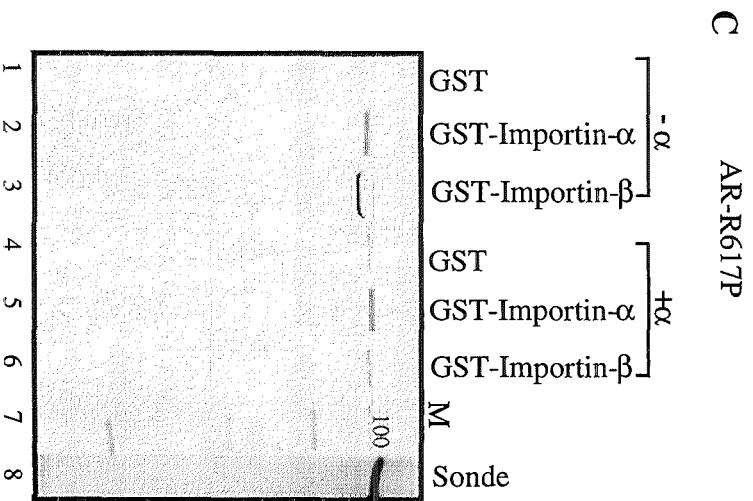
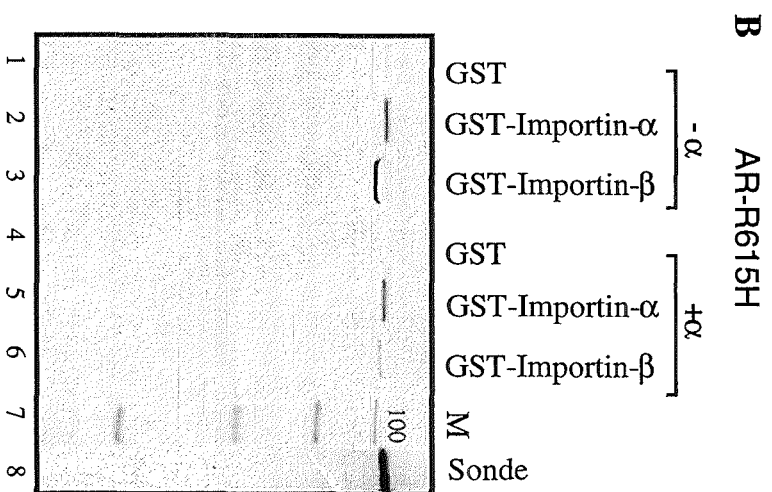
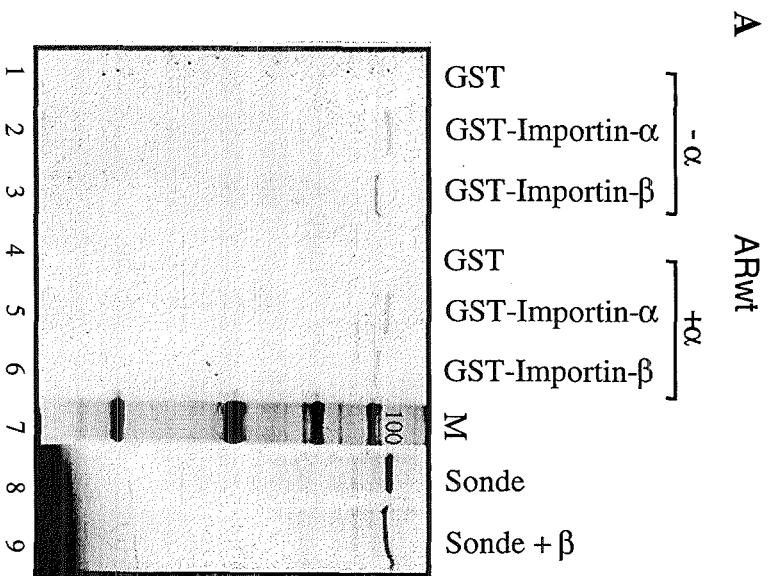


Abb. 9: Importin- α kompetitiert mit AR um die Bindung zu Importin- β . GST-Fusionsprotein-Interaktionstest mit GST, GST-Importin- α , GST-Importin- β , Importin- α und *in vitro* translatierten ARwt (A), AR-R615H (B), AR-R617P (C) und β -Gal-SV40NLS (D). Je 20 μ g bakteriell exprimiertes GST, GST-Importin- α oder GST-Importin- β Fusionsprotein wurde an 20 μ l (1:1 in PBS) Glutathion-Agarose gekoppelt und mit je 10 μ l *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem und hormonbehandeltem ARwt, AR-R615H, AR-R617P oder nicht behandeltem β -Gal-SV40NLS inkubiert. Jeweils im Falle der Proben 4-6 wurde vorher 1 h mit 50 μ g nicht radioaktiv markiertem Importin- α , das durch Thrombinspaltung aus GST-Importin- α gewonnen wurde, inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 8 wurde jeweils 3 μ l des im Test eingesetzten *in vitro* translatierten Proteins aufgetrennt. In Spur 9 in Abb. 9 A wurden 3 μ g GST-Importin- β zusammen mit 3 μ l AR aufgetragen. Die Zahlen in Spuren 7 bezeichnen die Banden eines Molekulargewicht-Standards in kDa.

Ohne Importin- α als Kompetitor binden GST-Importin- α und- β , den Wildtyp AR, AR-R615H und AR-R617P (Abb. 9 A-C, jeweils die Spuren 2 u. 3), GST allein hingegen nicht (jeweils die Spuren 1, Pfeil). β -GAL-SV40NLS wird nur von GST-Importin- α erkannt (Abb. 9 D, Spur 2). Nach der Inkubation der GST-Fusionsproteine mit Importin- α ist zu erkennen, daß die Bindung der Androgenrezeptoren an Importin- β deutlich verringert ist (Abb. 9 A-C, jeweils die Spuren 6). Die Interaktion der Rezeptoren mit GST-Importin- α wurde durch die vorherige Behandlung mit Importin- α nicht beeinflusst (Abb. 9 A-C, jeweils die Spuren 5). Die Bindung der radioaktiv markierten Rezeptoren an GST allein (Abb. 9 A-C, Spuren 1 u. 4) sind unspezifisch und je nach Waschungen mal stärker oder gar nicht ausgeprägt.

Da Importin- α die Bindung vom Androgenrezeptor, beziehungsweise der Mutanten AR-R615H und AR-R617P, an GST-Importin- β zu kompetitieren vermag, ist zu vermuten, daß die Bindung zu Importin- β unspezifisch ist. Wahrscheinlich würde eine bessere Kompetition dazu führen, daß nur noch die Interaktion mit Importin- α zu sehen ist.

Die Befunde aus 2.1 zeigen, daß die Beeinträchtigung der Funktion der DNA-Bindedomäne durch die Mutationen im Androgenrezeptor nicht der einzige Effekt ist, den die Mutationen bewirken. Die Immunofluoreszenz- und Importanalysen konnten zeigen, daß die mutierten Androgenrezeptoren nicht in den Zellkern transportiert werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sie trotz Mutation fähig waren in Protein-Interaktionsexperimenten an beide NLS-Rezeptoren, Importin- α und Importin- β , zu binden, welches dem ersten Schritt des Kerntransports entspricht. Die Bindung zu Importin- β konnte aber durch Importin- α kompetitiert werden, was dafür spricht, daß Importin- β mit den Androgenrezeptoren nicht spezifisch interagiert, sondern eher unspezifisch.

2.2 Ergebnisse 2. Teil: Charakterisierung der Funktion von N-terminalen Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors und einer natürlich vorkommenden Mutation im AR eines Patienten mit Reifensteinsyndrom

Der Androgenrezeptor (AR) wird zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gezählt, welche durch Ligandenbindung aktiviert, die Expression von Genen regulieren. Strukturell sind sie aus drei Hauptdomänen aufgebaut, einer N-terminalen modulierenden Region, einer zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer C-terminalen Hormonbindungsdomäne (HBD). Zwischen den Mitgliedern dieser Familie sind die DBD und HBD relativ gut konserviert und deren Struktur und Funktion schon gut charakterisiert. Die N-Termini der Steroidhormonrezeptoren haben hingegen sehr unterschiedliche Sequenzen und nur sehr wenig ist über ihre Struktur und Funktion bekannt. Bekannt ist, daß sie bei der Transaktivierung von Genen eine große Rolle spielen (zur Übersicht siehe Beato, 1993, Beato et al., 1995, Mangelsdorf et al., 1995).

Der N-Terminus des Androgenrezeptors besitzt mindestens zwei Regionen mit transaktivierenden Eigenschaften, die beide für eine vollständige transaktivierende Wirkung benötigt werden (Jenster et al., 1991 u. 1992, Simental et al., 1991, Chamberlain et al., 1996). Kürzliche Untersuchungen haben gezeigt, daß N-terminale Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors auch reprimierende Eigenschaften besitzen (Kalio et al., 1995, Schneikert et al., 1996). Neben diesen langsamen, genomischen Wirkungen, weist der Androgenrezeptor nach Hormoninduktion, wie schon für andere Steroidhormonrezeptoren gezeigt (Caelles et al., 1997, Migliaccio et al., 1996, Endoh et al., 1997, Marcinkowska et al., 1997, Picard, 1998, Grazzini et al., 1998, Peterziel, persönliche Mitteilung) auch schnelle, nichtgenomische Eigenschaften auf, welche schon im Zytoplasma vermittelt werden. Welche Domänen des Androgenrezeptors für diese Wirkung zuständig sind, ist bisher noch nicht untersucht worden. Um die Rolle, die der N-Terminus in der Funktion des Androgenrezeptors wahrnimmt, zu untersuchen, wurde dieser einer systematischen Analyse unterzogen. Hierzu wurden Deletionsmutanten und chimäre Androgenrezeptorkonstrukte in DNA-Bindungs-, Transaktivierungs- und Transrepressionsexperimenten eingesetzt.

Zusätzliche Informationen zur Funktion des N-Terminus liefern Berichte über Mutationen im N-terminalen Bereich. N-terminale Mutationen im Androgenrezeptorgen führen meist zu Leserahmenverschiebungen und schließlich zu Stop-Kodons, wodurch verkürzte, funktionsunfähige Rezeptorproteine exprimiert werden, die in Patienten komplette Androgeninsensitivität (CAIS) verursachen (zur Übersicht siehe Quigley et al, 1995, Gottlieb et al., 1998 und "*The androgen receptor mutations database*" im Internet:

<http://www.mcgill.ca/androgendb/>). Nur zwei Berichte, in denen Mutationen im N-Terminus beschrieben werden, die nicht zu trunkierten oder deletierten Rezeptoren führten, sind bisher bekannt. Choong et al., 1996 beschreiben eine Punktmutation im AR-Gen, welche zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Lysin führt, und partielle Androgeninsensitivität (PAIS) in einem Patienten verursacht, ohne den Leserahmen zu verändern (Choong et al. 1996). Transiente Experimente mit dieser Mutante zeigten, daß die Expression des Rezeptorproteins um 20-50% und die Transaktivierung um 50%, im Vergleich zum Wildtyp-AR, reduziert war. Ein Fall von CAIS wird auch von Vasiliou et al. vorgestellt (Vasiliou et al., 1994). Dabei handelt es sich gleich um zwei Aminosäureaustausche im N-Terminus (P390R u. Q443R), die aber beide keine Leserasterverschiebung erzeugen. Androgenbindungsstudien in Genitalhautfibroblasten mit diesem mutierten AR waren negativ, aber es sind bisher keine funktionellen Analysen mit dieser Mutante unternommen worden, die Aufschluß über die Fehlfunktion des AR geben könnten.

Eine weitere Mutation im N-terminalen Bereich des Androgenrezeptorgens wurde in diesem Teil der Arbeit charakterisiert. Sie wurde von H. Klocker und C. Radmayr von der Universitätsklinik für Urologie in Innsbruck, Österreich, bei einem Patienten mit partieller Androgeninsensitivität gefunden. Die Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Glyzin zu Glutaminsäure an Position 474, verursacht also keine Leserastermutation. Es war deshalb interessant den Mechanismus für die Fehlfunktion des AR zu untersuchen und dadurch eventuell mehr über die Funktionsweise des N-terminalen Bereichs des Androgenrezeptors zu erfahren.

2.2.1 Die DNA-Bindung des Androgenrezeptors ist nicht von spezifischen N-terminalen Sequenzen abhängig

Daß N-terminale Bereiche wichtig für die DNA Bindung des Androgenrezeptors sind wurde in Gast et al. 1995 gezeigt. Die N-terminal trunkierten Androgenrezeptoren AR Δ 473 und AR Δ 536 waren nicht fähig als Homodimere an ein Androgenresponsives Element (ARE) zu binden, obwohl die DNA-Bindedomäne intakt war. Die Bindung konnte aber entweder durch Stabilisierung des Homodimers mit Hilfe eines C-terminalen Antikörper oder, wie für AR Δ 536 gezeigt, durch Formung eines Heterodimers mit dem N-Terminus enthaltenen Wildtyp-AR wiedererlangt werden. Um spezifischere Sequenzen des AR, die für DNA-Bindung notwendig sind, zu definieren, wurden Gelretardationsanalysen mit verschiedenen N-terminal deletierten (AR Δ 188, AR Δ 320, AR Δ 340, AR Δ 360, AR Δ 440, AR Δ 473, AR Δ 488, AR Δ 510 und AR Δ 536, siehe Abb. 10), mit einigen internen Deletionsmutanten (AR Δ 447-536, AR Δ 488-536, AR Δ 447-473 und AR Δ 510-536, Abb. 10) und mit drei chimären AR-Fusionsproteinen,

bei denen N-terminale Sequenzen durch neutrale nicht-verwandte Sequenzen ersetzt wurden (AR Δ 473/NF1X3, AR Δ 510/NF1X3 und AR Δ 536/NF1X3, Abb. 10), durchgeführt (siehe Abb. 10, welche eine Übersicht über die verwendeten AR-Mutanten zeigt).

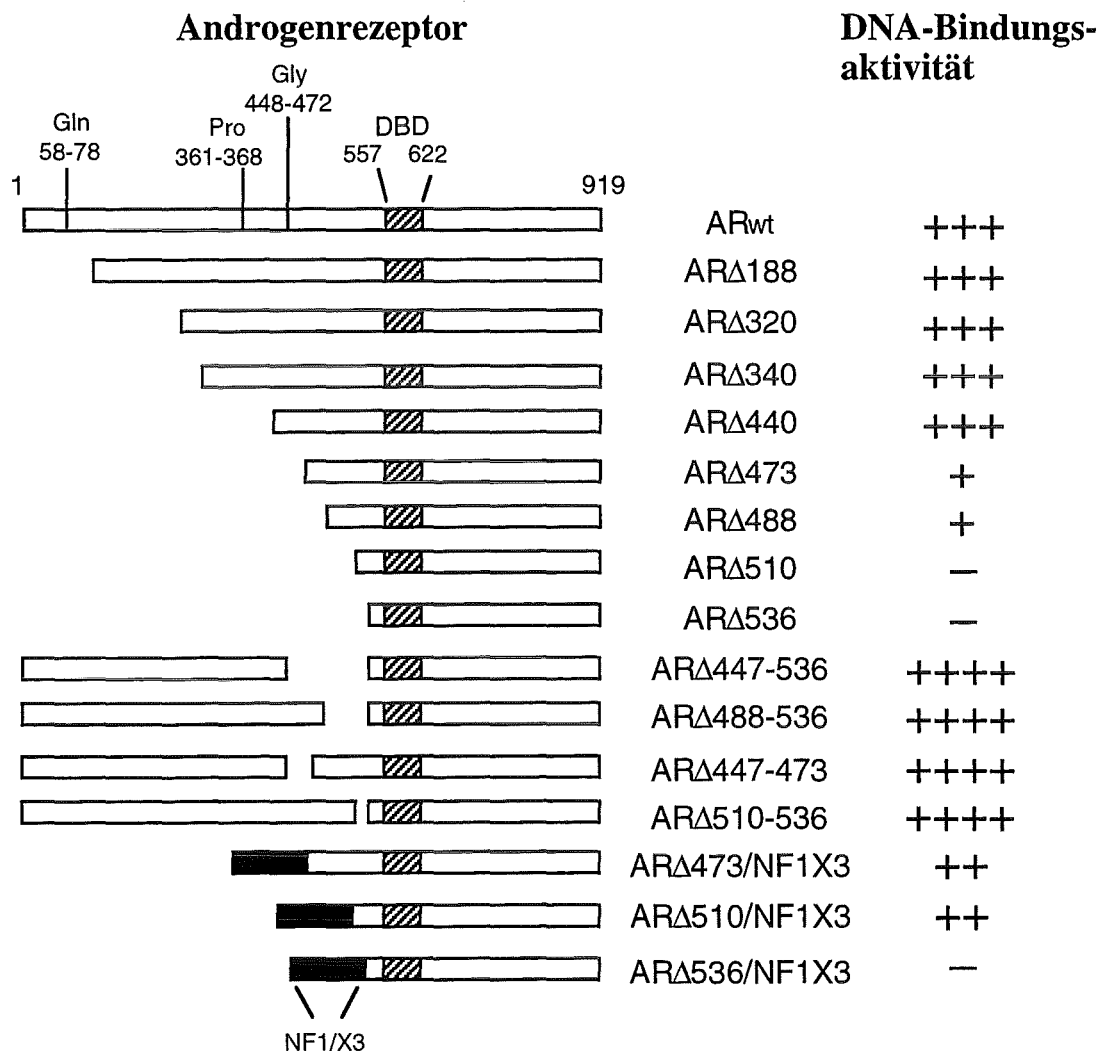


Abb. 10: Schematische Darstellung der verwendeten Deletionsmutanten und Chimären des AR und deren qualitative Bewertung der DNA-Bindung. Die Zahlenangaben beim Wildtyp-Androgenrezeptor (Arwt) bedeuten Aminosäurepositionen. Gln=Glutamin, Pro=Prolin, Gly=Glycin, DBD=DNA-Bindedomäne, NF1/X3=Sequenz des nukleären Transkriptionsfaktors, die keine transaktivierende Aktivität besitzt.

Die entsprechenden Expressionsplasmide für die Mutanten und des Wildtyp-AR wurden in AR-negative Cos-7 Zellen durch Elektroporation transient transfiziert und mit Dihydrotestosteron (DHT), oder dem Lösungsmittel als Kontrolle, behandelt. Mit Gesamtzellextrakten aus diesen Zellen wurden Gelretardationsanalysen (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) und Immunoblots (*western blot*) durchgeführt.

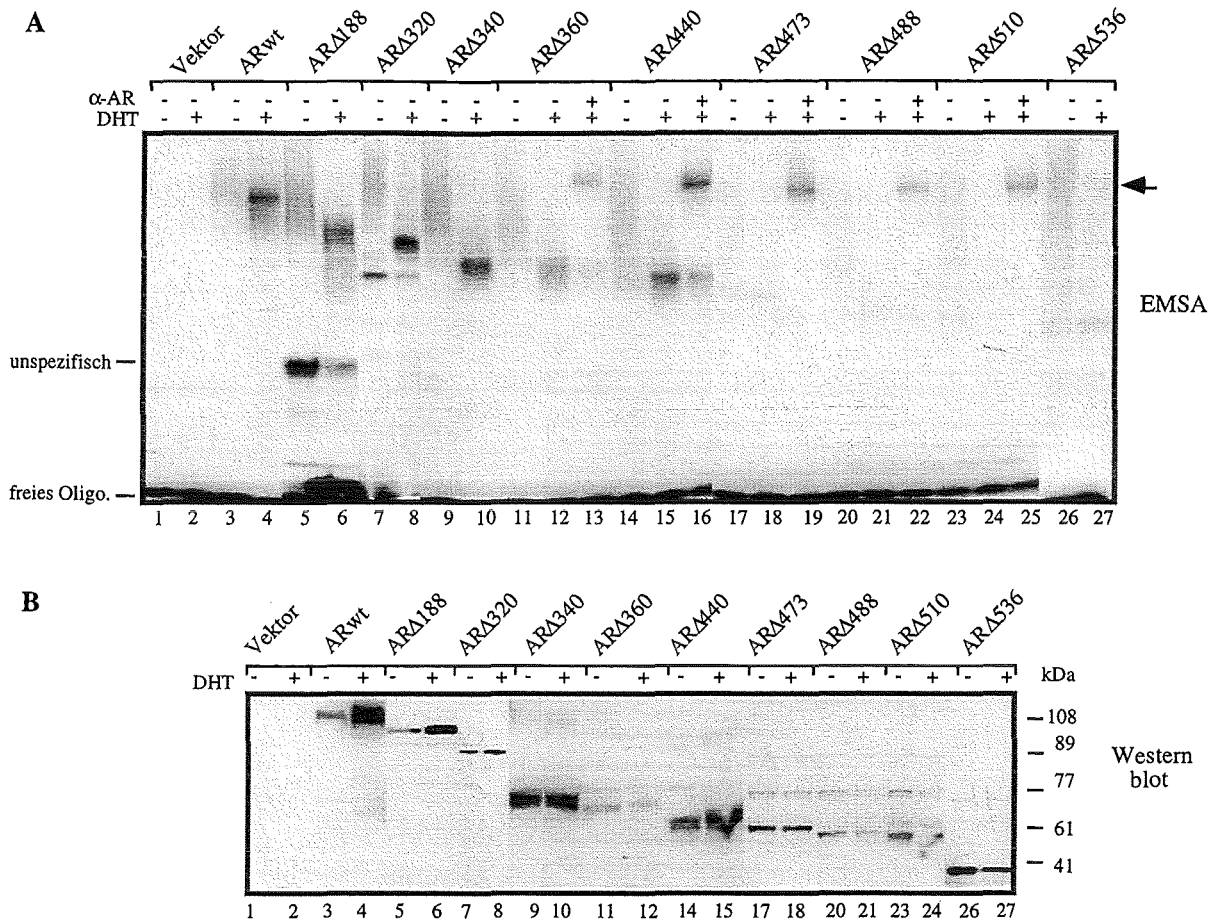


Abb. 11: DNA-Bindungsanalyse mit Wildtyp AR und verschiedenen N-terminal trunkierten Mutanten des AR. A) Gelretardationsanalyse (electrophoretic mobility shift assay, EMSA). Je 15 µg leerer Expressionsvektor, Expressionsvektor mit Wildtyp-AR, oder den AR-Deletionsmutanten ARΔ188, ARΔ320, ARΔ340, ARΔ360, ARΔ440, ARΔ473, ARΔ488, ARΔ510 und ARΔ536 wurden mittels Elektroporation in Cos-7 Zellen transfiziert und mit Androgen (DHT, Endkonzentration 10^{-7} M) oder der gleichen Menge 80%igem Ethanol behandelt. Je 20 µg eines Gesamtzellextraktes der Zellen wurden zuerst 10 min mit 1 µg poly(dI/dC) auf Eis (bei der Antikörperreaktion in den Spalten 13, 16, 19, 22 u. 25 wurde gleichzeitig 1 µl C-terminaler SPO66-Antikörper (erhalten von A. Brinkmann) zugegeben, dann 20 min mit radioaktiv markiertem ARE-Oligonukleotid (10.000cpm, 2fmol) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden dann auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Der Pfeil zeigt die AR-DNA-Antikörper-Komplexe (*supershift*). α-AR = Antikörper SPO66. Freie Oligo. = Freie radioaktiv markierte Oligonukleotide. Die Komplexe der markierten DNA mit unspezifischen Proteinen sind angezeigt. B) Immunoblot (western blot) mit 20 µg des Gesamtzellextraktes der Cos-7 Zellen aus A. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Anschließend wurde die Membran mit dem Anti-AR Antikörper SPO66 (Epitop AS 301-320) inkubiert und mit Hilfe des *enhanced chemolumineszens* (ECL)-Systems detektiert. Die Molekularmassen eines Proteinstandardmarkers sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

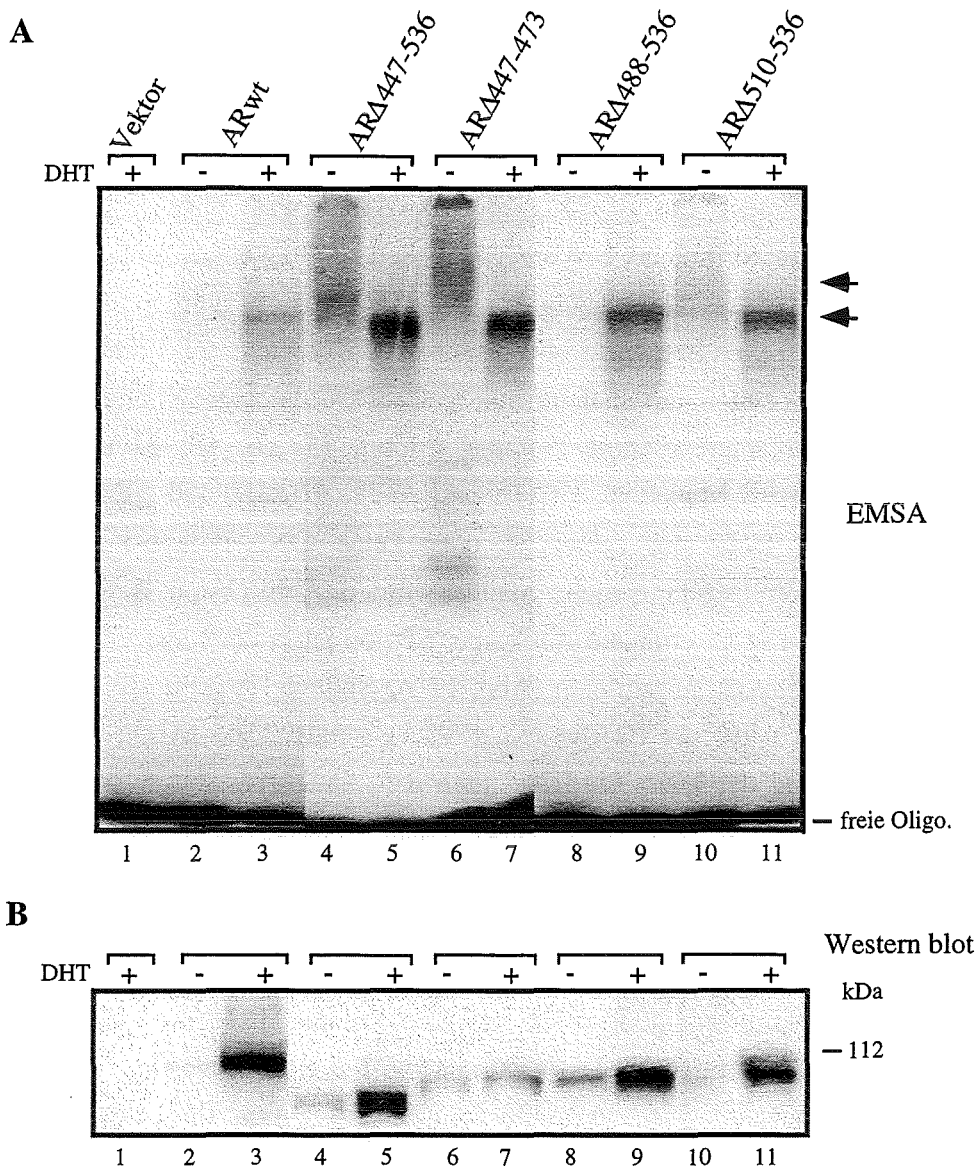
Extrakte aus Leervektor-transfizierten Zellen bilden weder mit noch ohne DHT einen DNA-Protein-Komplex (Abb. 11 A, Spur 1 u. 2). Wie in Abb. 11 B zu sehen ist, kann in einigen Fällen die Inkubation mit Hormon das Rezeptorprotein stabilisieren, wodurch die Proteinmenge zunimmt (Abb. 11 B, vergleiche Spuren 3 u. 4, 5 u. 6, 7 u. 8, 14 u. 15). Der Wildtyp-Androgenrezeptor und die N-terminal deletierten AR-Mutanten ARΔ188, ARΔ320, ARΔ340,

AR Δ 360 und AR Δ 440 binden mit und ohne Hormon (DHT) an das radioaktiv markierte „androgen responsive element (ARE)“ und formen DNA-Protein-Komplexe, die in der Gelelektrophorese, im Vergleich zum freien ARE deutlich langsamer laufen (Abb. 11 A u. B, vergleiche jeweils die Spuren 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 u. 14-15). Die Anwesenheit des Liganden verstärkt erstens die Bindung an das ARE, was unter anderem durch die Stabilisierung des Rezeptorproteins hervorgerufen wird, und zweitens führt es dazu, daß sich das Laufverhalten des Komplexes, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine Konformationsänderung, ändert. Das Laufverhalten der Komplexe wird durch die Inkubation mit einem AR-spezifischen, C-terminalen Antikörper (SPO66) nochmals retardiert (Abb. 11 A, AR-DNA-Antikörper-Komplexe (*supershift*) bei Spuren 13, 16, 19, 22 u. 25, Pfeil). Die N-terminal verkürzten AR-Mutanten, AR Δ 473, AR Δ 488, AR Δ 510 und AR Δ 536, bilden auch in Anwesenheit von DHT nur schwache oder keine DNA-Protein-Komplexe, obwohl ausreichende Mengen an Rezeptorprotein gebildet wurden (Abb. 11 A u. B, Spuren 17-18, 20-21, 23-24 u. 26-27). Der C-terminale Antikörper SPO66 ist in der Lage, die verlorene DNA-Bindung dieser Mutanten zu restaurieren (Abb. 11 A, Spuren 19, 22 u. 25, Pfeil, *Supershift* der AR Δ 536 Mutante wurde in Gast et al., 1995, gezeigt). Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Stabilisierung der DNA-Bindung durch den Antikörper. Nach diesen Ergebnissen kann man vermuten, daß (i) N-terminale Aminosäuresequenzen, die nahe an der DNA-Bindungsdomäne (DBD) des Androgenrezeptors liegen die DNA-Bindung hemmen (Aminosäuren 473-536, vergleiche in Abb. 10), oder (ii) daß Bereiche im N-terminalen Ende die DNA-Bindung verstärken (Aminosäuren 1-440, vergleiche in Abb. 10).

Um die erste Annahme zu überprüfen, wurden interne Deletionsmutanten des AR in Gelretardationsanalysen untersucht. Dazu wurden die Expressionsplasmide der internen AR-Deletionsmutanten AR Δ 447-536, AR Δ 488-536, AR Δ 447-473 und AR Δ 510-536 (siehe Abb. 10, für die Struktur dieser Mutanten), in Cos-7 Zellen transfiziert und mit den Extrakten Gelretardationsanalysen und Immunoblots, wie schon beschrieben, durchgeführt.

Abb. 12: Interne N-terminale Deletionsmutanten des AR zeigen verstärkte DNA-Bindung.

A) Gelretardationsanalyse mit je 15 μ g leerer Expressionsvektor, Expressionsvektor mit Wildtyp-AR, oder den internen AR-Deletionsmutanten AR Δ 447-536, AR Δ 488-536, AR Δ 447-473 und AR Δ 510-536 wurden mittels Elektroporation in Cos-7 Zellen transfiziert und mit Androgen (DHT, Endkonzentration 10^{-7} M) behandelt. 20 μ g eines Gesamtzellextraktes der Zellen wurden zuerst 10 min mit 1 μ g poly(dI/dC) auf Eis, dann 20 min mit radioaktiv markiertem ARE-Oligonukleotid (10.000cpm, 2fmol) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Pfeile zeigen AR-DNA-Komplexe, die mit und ohne Hormon ein unterschiedliches Laufverhalten aufweisen. Freie Oligo. = Freie radioaktiv markierte Oligonukleotide. B) Immunoblot mit 20 μ g des Gesamtzellextraktes aus A. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Anschließend wurde die Membran mit dem Anti-AR Antikörper SPO66 inkubiert und mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Die Größe eines Standardmolekulargewichtsmarkers ist in Kilodalton angegeben.



Wie schon in Abb. 11 B gesehen, kann durch Inkubation mit DHT die Androgenrezeptormenge in den Extrakten stabilisiert werden (Abb. 12, vergleiche jeweils die Spuren 2 u. 3, 4 u. 5, 8 u. 9, 10 u. 11), im Ansatz mit AR Δ 447-473 nur leicht, was aber nicht erklärt werden kann (Abb. 12 B, Spuren 6 u. 7). Die internen N-terminalen Deletionen der Aminosäuren 447-536, 488-536, 447-473 und 510-536 im Androgenrezeptorprotein haben eine Verstärkung der DNA-Bindung des AR zur Folge, obwohl die eingesetzte AR-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp-AR eher weniger zu sein scheint (Abb. 8 A u. B, vergleiche Spuren 2 u. 3 mit 4-11). Dies läßt vermuten, daß Aminosäurebereiche, die sich in der Nähe zur DBD befinden, sich negativ auf die DNA-Bindung auswirken. Es ist auch möglich, daß die durch die Deletionen an die DBD herangerückten N-terminalen Aminosäuren, die Bindung positiv beeinflussen.

Wenn nahe Aminosäuren des N-Terminus zur DBD, einen negativen Effekt auf die DNA-Bindung des Rezeptors ausüben, dann müßte ein Austausch gegen nicht-spezifische Aminosäuresequenzen, die keinen negativen Effekt vermitteln, eine Verstärkung der DNA-Bindung hervorrufen. Um dies zu untersuchen, wurden die trunkierten Androgenrezeptoren AR Δ 473, AR Δ 510 und AR Δ 536, welche nur noch schwache oder keine DNA-Bindung zeigen, durch Fusion mit 79 Aminosäuren des Transkriptionsfaktors NF1-X3 N-terminal verlängert (Nebel und Cato, 1995, siehe auch Abb. 1). Diese Aminosäuresequenz besitzt keine transaktivierenden oder transreprimierenden Eigenschaften (Nebel und Cato, 1995), wodurch die Konstrukte auch in Bezug auf Transaktivierung und Transrepression untersucht werden konnten (siehe unten). Mit diesen Fusionskonstrukten (AR Δ 473/NF1X3, AR Δ 510/NF1X3 und AR Δ 536/NF1X3) wurden Gelretardationsanalysen und Immunoblots, wie schon beschrieben, durchgeführt.

A

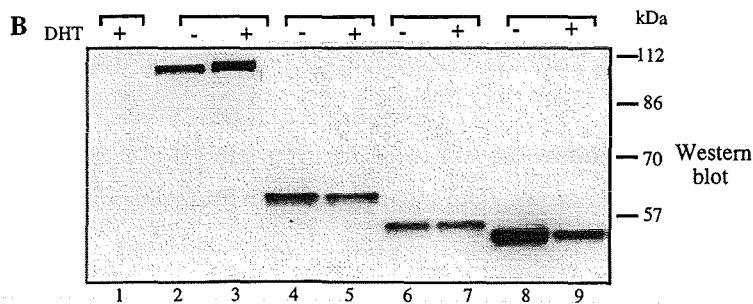
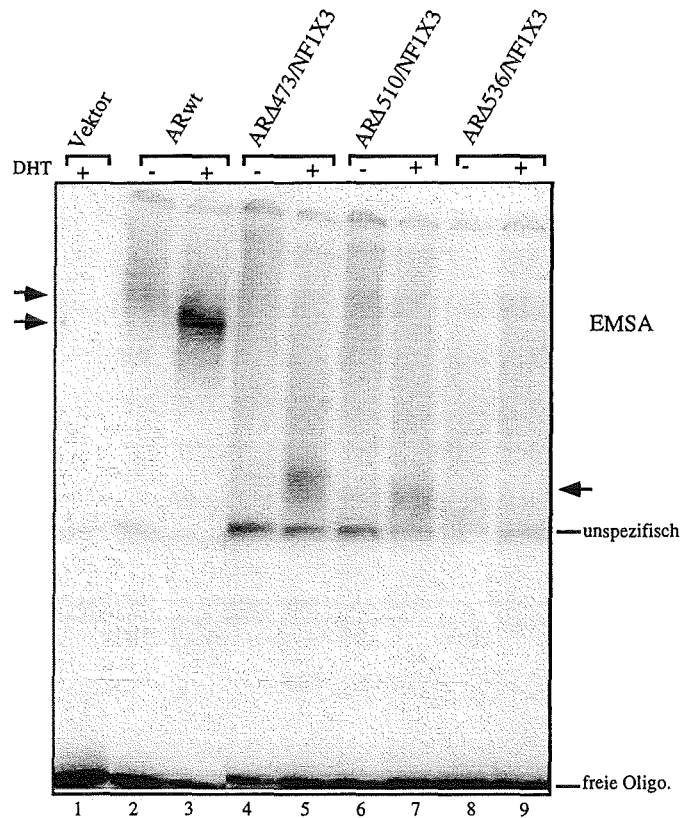


Abb. 13: Verlängerung des N-Terminus der DNA-Bindungsdefekten AR-Mutanten AR Δ 447, AR Δ 510 und AR Δ 536 durch unspezifische Aminosäuren führt teilweise zum Wiedererlangen der DNA-Bindung. A) Gelretardationsanalyse (EMSA) mit je 20 μ g eines Gesamtzell-extraktes von Cos-7 Zellen die nur mit Expressionvektor oder Wildtyp-AR-Vektor oder den chimären AR-Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Zuerst wurde 10 min mit 1 μ g poly(dI/dC) auf Eis, dann 20 min mit radioaktiv markiertem ARE-Oligonukleotid (20.000cpm, 2fmol) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und die Komplexe auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt. Pfeile zeigen AR-DNA-Komplexe. Freie Oligo. = Freie radioaktiv markierte Oligonukleotide. Unspezifische Komplexe sind angezeigt. B) Immunoblot (Western blot) mit 20 μ g des Gesamtzell-extraktes aus A. Die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nylonmembran geblottet, anschließend mit dem Anti-AR Antikörper SPO66 inkubiert und mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Die Größen eines Standardmolekulargewichtsmakers ist in Kilodalton (kD) angegeben.

Wildtyp-AR-Extrakte bilden, wie schon in Abb. 10 u. 11 gesehen, die typischen Bindungskomplexe ohne und mit Hormon (Abb. 13, Spur 2 u. 3). Die DNA-Bindung, die durch N-terminale Deletionen der Aminosäuren 1-474 bzw. 1-510 verlorenging, kann durch die Fusion mit einer 79 Aminosäuren langen Sequenz des Transkriptionsfaktors NF1-X3 teilweise wiedererlangt werden (Abb. 13 A, Spuren 5 u. 7, rechter Pfeil). Die Mutante AR Δ 536 zeigt nach der Fusion mit den 79 Aminosäuren weiterhin keine DNA-Bindung, trotz ausreichender Menge an Rezeptorprotein (Abb. 13 A u. B, Spuren 8 u. 9). In diesem Experiment konnte keine Stabilisierung der Proteinmenge durch Hormonbehandlung festgestellt werden, die Gründe dafür sind nicht klar (Abb. 13 B, vergleiche jeweils -/+ DHT).

Da die Mutante AR Δ 510 keine DNA-Bindung zeigte (Abb. 11), durch die Verlängerung des N-terminalen Bereichs mit der NF1X3-Sequenz aber wieder bindet, ist anzunehmen, daß die DNA-bindenden Eigenschaften des N-terminus vom menschlichen Androgenrezeptor nicht sequenzspezifisch sind, sondern daß eher eine bestimmte N-terminale Länge für die Stabilisierung des Rezeptor-DNA-Komplexes notwendig ist.

2.2.2 Transaktivierende und transreprimierende Eigenschaften des N-Terminus vom Androgenrezeptor

Der N-terminus des Androgenrezeptors ist durch das Exon 1 im Androgenrezeptorgen codiert welches mehr als die Hälfte des Androgenrezeptorproteins darstellt (Aminosäuren 1-537, Quigley et al., 1995). Dieser große Bereich, der zwischen den Steroidrezeptoren nicht konserviert ist, besitzt sowohl transaktivierende als auch reprimierende Eigenschaften (Simental et al., 1991, Jenster et al., 1991 u. 1992, Kallio et al., 1995, Schneikert et al., 1996). Besonderheiten des N-Terminus vom Androgenrezeptor sind drei homopolymere Regionen von Aminosäuren; (i) eine variable poly-Glutamin-Region (Aminosäuren 58-78), die bei Patienten mit der neurodegenerativen Krankheit SBMA (spinale und bulbäre Muskelatrophie, Kennedysyndrom) verlängert ist (La Spada, 1991), und für die gezeigt wurde, daß sie durch

Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren, transaktivierende Eigenschaften vermittelt (Gerber et al., 1994); (ii) eine homopolymere Prolinsequenz (Aminosäuren 361-368), deren transaktivierende Eigenschaft *in vitro*, mit der Polymerlänge zunimmt (Gerber et al., 1994) und (iii) eine Glyzin-Wiederholung (Aminosäuren 448-472), für die noch keine Funktion beschrieben wurde.

Transaktivierende Eigenschaften des N-Terminus werden den ersten 338 Aminosäuren zugeschrieben (Simental et al., 1991), und dieser Bereich kann in mindestens zwei unterschiedliche Regionen (51-211, und 244-360) unterteilt werden, welche beide zur Transaktivierung beitragen (Jenster et al., 1991 u. 1992). Es wurde gezeigt, daß die DNA-Bindedomäne (DBD) zu einer Rezeptormutante, die keine transaktivierenden Eigenschaften mehr besitzt, führt, zumindest in Bezug auf ein typisches androgenresponsives Element (ARE) enthaltene Reporterkonstrukt (*mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyl transferase*, MMTV-CAT, Jenster et al., 1991 u. 1992, Zhou et al., 1995). Für die Transaktivierung ist die Bindung an AREs im Promotorbereich von Zielgenen unbedingt erforderlich, denn auch Deletionsmutanten, denen beides fehlt, die DBD und die Hormonbindungsdomäne (HBD), sind nicht mehr fähig Reporterkonstrukte zu transaktivieren, obwohl der N-Terminus intakt bleibt (Simental et al., 1991, Jenster et al., 1991 u. 1992). Eine vor kurzem erschienene Veröffentlichung von Kallio et al., lieferte Ergebnisse, die zeigten, daß der Androgenrezeptor, auch ohne direkten Kontakt mit DNA, Transaktivierung vermitteln kann (Kallio et al., 1995).

Daß der Androgenrezeptor auch reprimierende Eigenschaften besitzt, wurde kürzlich gezeigt (Kallio et al., 1995, Schneikert et al., 1996). Kallio et al. untersuchten die reprimierende Fähigkeit des AR aus Ratten. Sie konnten zeigen, daß für die Repression eine intakte DNA-Bindungsdomäne und N-terminale Bereiche des Ratten-AR notwendig sind. In der Studie von Schneikert et al. wurde gezeigt, daß Deletionsmutanten des menschlichen AR bis zur Aminosäureposition 510, noch fähig sind zu reprimieren, aber eine Deletion bis Position 536 die reprimierende Eigenschaft aufhebt. Bis jetzt ist es jedoch noch nicht gelungen, die transaktivierenden und transreprimierenden Funktionen des Androgenrezeptors zu trennen.

Um die transaktivierenden von transreprimierenden Eigenschaften des N-Terminus funktionell zu unterscheiden und die Rolle, die die homopolymeren Regionen in der Vermittlung transaktivierender und reprimierender Eigenschaften des AR spielen, weiter zu analysieren, wurden die Deletionsmutanten und chimären AR, die in den DNA-Bindungsanalysen verwendet wurden, in Transaktivierungs- und Transreprimierungsanalysen eingesetzt. Für die Transaktivierungsexperimente wurden CV-1 Zellen nach der Kalziumphosphat (CaPO_4)-Methode mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und einem Reporterkonstrukt (MMTV-Luc) transient kotransfiziert. Nach 40 Stunden Hormonbehandlung (DHT) wurden die Zellen

geerntet und die Luziferaseaktivität gemessen. Die Repression wurde ebenfalls in CaPO_4 -transfizierten CV-1 Zellen untersucht. Hierbei wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, das aus einem Teil des Promotors vom menschlichen Kollagenase I Gens, der an das Luziferase-Reporter gen fusioniert wurde (-517/+63 Coll-Luc) und durch den Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) induziert werden kann. Der Promotor dieses Konstrukts wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren Jun und Fos, welche als AP-1-Dimer an die DNA binden und ihrerseits durch den Phorbol-ester TPA aktiviert werden, aktiviert. Nach gleichzeitiger Induktion von TPA und DHT für 40 h wurden die Zellen geerntet und der Luziferaseanalyse unterzogen. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten und den DNA-Bindungsanalysen wurden in Abb. 14 zusammengefasst (Seite 37). Auf der linken Seite sind der Androgenrezeptor und die Mutanten schematisch dargestellt. Die schraffierten Bereiche repräsentieren die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die schwarzen Regionen stellen die 79 Aminosäuren lange Sequenz von NF1/X3 dar, welche für die Konstruktion der chimären Rezeptoren verwendet wurde. Die homopolymeren Glutamin- Prolin- und Glyzinbereiche sind als Gln, Pro und Gly angegeben. Die Balkendiagramme repräsentieren die relative Transaktivierung des Reporterkonstrukts MMTV-Luc, bzw. die relative Repression des TPA induzierten Reporterkonstrukts -517/+63 Coll-Luc, wobei die Ergebnisse aus mindestens drei verschiedenen Experimenten stammten, und zum Wildtyp-AR, dessen Wert als 1,0 gesetzt wurde, relativiert wurden.

Die Transaktivierungsergebnisse sind im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Werten, die zeigen, daß Deletionen bis Aminosäure 338 die transaktivierende Fähigkeit des AR zerstören (Simental et al., 1991). In dieser Arbeit hatten Deletionen bis Aminosäure 440 eine Reduktion der relativen Transaktivierung von etwa 70%, weitere Deletionen darüberhinaus mehr als 90% zur Folge (Abb. 14, vergleiche ARwt mit AR Δ 440 und AR Δ 473 bis AR Δ 536). Dies ist zum Teil auch mit der DNA-Bindung vergleichbar, die mit größer werdender Deletion schwächer wird (Abb. 14, vergleiche Transaktivierung mit DNA-Bindung von AR Δ 440 bis AR Δ 536). Eine Deletion, die die homopolymere Glutaminregion beinhaltet, äußerte sich nur in einer schwachen Reduzierung von etwa 25% (Abb. 14, siehe AR Δ 188). Die Deletionsmutante AR Δ 440, bei der die Prolin-Wiederholungen mitdeletiert wurden, zeigte gegenüber der Mutante AR Δ 340 (mit Prolin-Region) eher eine Verstärkung der Transaktivierung (Abb. 14, vergleiche AR Δ 340 mit AR Δ 440). Eine weitere Deletion bis Aminosäure 473, wodurch die homopolymere Glyzin-Region deletiert wurde, hatte eine totale Reduktion der Transaktivierungsaktivität zur Folge (Abb. 14, AR Δ 473). Die Ergebnisse von den Deletionen der homopolymeren Regionen sind schwer interpretierbar, da diesen Mutanten auch Bereiche des N-Terminus fehlen, die für die Transaktivierung notwendig sind. Für die Untersuchung dieser homopolymeren Bereiche müssten spezifisch diese Regionen deletiert werden.

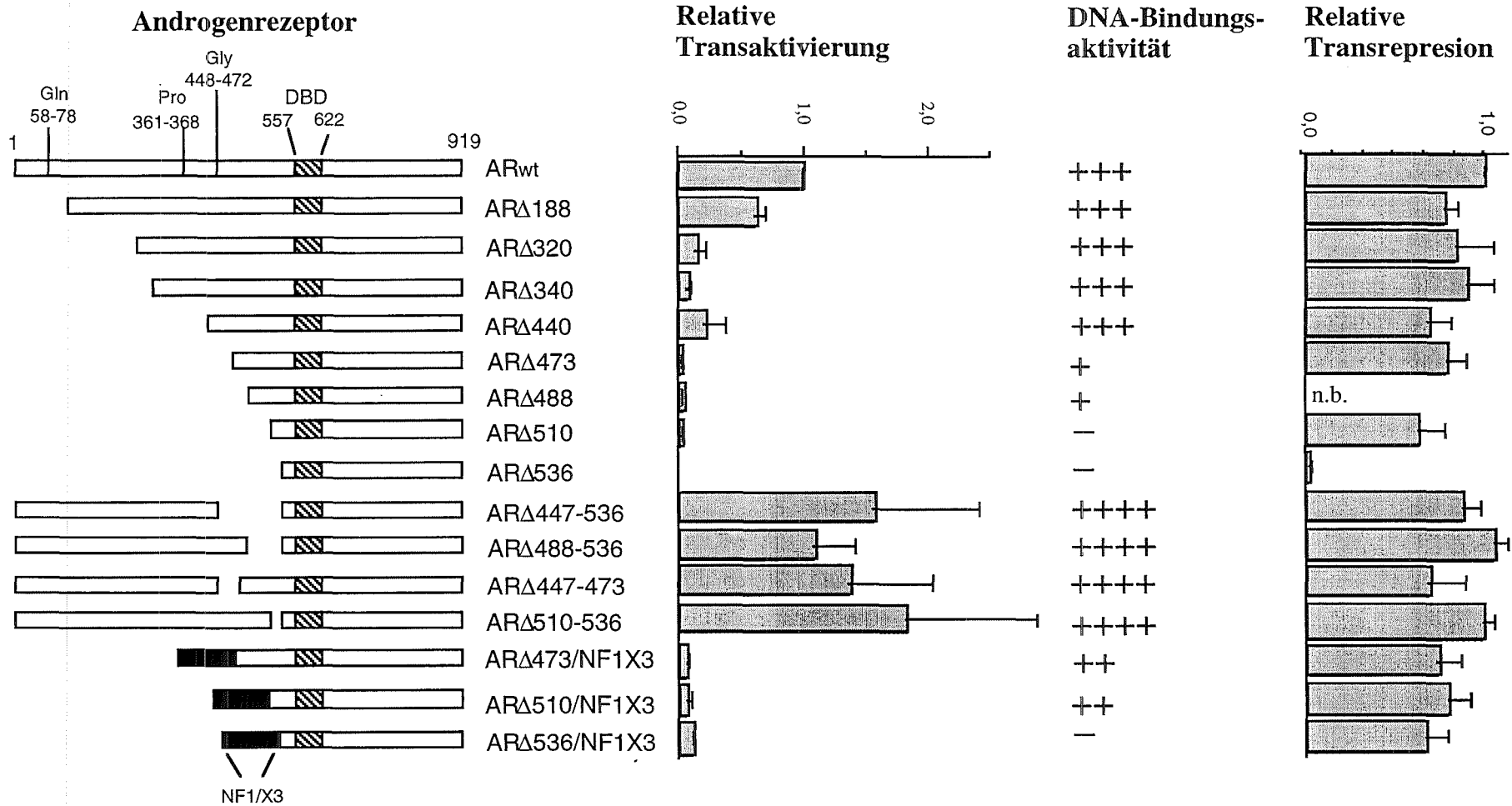


Abb. 14 : Schematisches Diagramm des Androgenrezeptors und der mutierten AR, und Zusammenfassung ihrer Transaktivierungs-, DNA-Bindungs-, und Transrepressionsaktivität. Die horizontalen Balken auf der linken Seite repräsentieren die Aminosäuresequenzen, die schraffierten Bereiche die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die schwarzen Bereiche die NF1/X3 Sequenz, die für die chimären Rezeptoren verwendet wurde. Die Balkendiagramme zeigen die relative Transaktivierung des MMTV-Reporterkonstrukts bzw. die relative Transrepression des Phorboloster (TPA)-induzierten Kollagenase I-Reporters. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten, wobei die Werte relativ zu dem als 1,0 gesetzten Wert des Wildtyp-ARausgedrückt wurden. Gln = Glutamin, Pro = Prolin u. Gly = Glyzin. n.b. = nicht bestimmt.

Durch interne Deletionen der Aminosäuren 447-536, 447-473 488-536 und 510-536 tritt eine Verstärkung der Transaktivierungsaktivität über den Wert des Wildtyp-AR hinaus ein, welche sich auch in der erhöhten DNA-Bindung widerspiegelt (Abb. 14, vergleiche Transaktivierung mit DNA-Bindung von AR Δ 447-536 bis AR Δ 510-536). Durch die Deletion der Aminosäuren 447-473 wird die homopolymere Glyzinregion entfernt. Da die Deletionsmutante AR Δ 447-473 die Transaktivierung verstärkt, kann man der deletierten Region eine hemmende Wirkung zuordnen.

Verlängerung des N-Terminus der Deletionsmutanten AR Δ 473, AR Δ 510 und AR Δ 536 mit 79 Aminosäuren von NF1/X3, äußerte sich in einer Wiedererlangung der DNA-Bindung in den Fällen AR Δ 473 und AR Δ 510, aber die transaktivierenden Fähigkeiten aller drei Chimären blieb dennoch reduziert (Abb. 14, vergleiche Transaktivierungs- und DNA-Bindung von AR Δ 447/NF1X3 bis AR Δ 536/NF1X3).

Der Vergleich DNA-Bindung mit Transaktivierungsaktivität zeigt, daß Mutanten die fähig sind, an DNA zu binden nicht immer transaktivieren können. Es ist deshalb davon auszugehen, daß Bereiche des N-Terminus des Androgenrezeptors, die zur Transaktivierung beitragen, spezifischer sein müssen, als jene, die die DNA-Bindung verstärken. Der Bereich mit dem größten Transaktivierungspotential des N-Terminus des AR ist nach diesen Ergebnissen zwischen Aminosäuren 1 und 320 lokalisiert, wobei die nachfolgende Glyzinregion eher hemmende Eigenschaften besitzt. Ob diese Regionen für die transreprimierende Eigenschaft des AR notwendig sind, bzw. welche Bereiche des N-Terminus dafür notwendig sind, wurde im nächsten Abschnitt erläutert.

Die transreprimierenden Eigenschaften sämtlicher Deletionsmutanten (außer AR Δ 488) des Androgenrezeptors und der chimären AR wurden im Vergleich zum Wildtyp-AR untersucht, indem ihr Potential ein Phorbolster (TPA) induziertes Reporterkonstrukt (-517/+63 Coll-Luc) zu hemmen, gemessen wurde (Abb. 14, „Relative Transrepression“). Deletionsmutanten mit trunkierten N-Termini bis Aminosäure 510 sind in der Lage, die Induktion der Expression von Luziferase durch TPA, im selben Maße wie der Wildtyp-AR, zu hemmen (Abb. 14, siehe ARwt bis AR Δ 510). Die Deletion der homopolymeren Aminosäurenbereiche hatte keinen Einfluß auf die reprimierende Aktivität des N-Terminus (Abb. 14, siehe relative Transrepression von AR Δ 188, AR Δ 440 u. AR Δ 473). Eine weitere Verkürzung bis zur Aminosäure 536 hat zur Folge, daß die hemmende Wirkung aufgehoben wird (Abb. 14, siehe AR Δ 536). Dieser Befund ließ vermuten, daß Aminosäuren zwischen 510 und 536 für die hemmende Aktivität des Androgenrezeptors wichtig sind. Durch Deletion dieses Bereichs wurden jedoch wieder hemmende Eigenschaften erlangt (Abb. 10, relative Transrepression, siehe AR Δ 447-536 bis AR Δ 510-536). Entweder haben Bereiche im N-Terminus des AR vor

den Deletionen die Aufgabe der Hemmung übernommen, oder N-terminale Bereiche tragen unspezifisch zur Hemmung bei. Um die zweite Annahme zu untersuchen, wurden chimäre AR, bei denen N-terminale Bereiche durch eine Aminosäuresequenz von NF1/X3 ersetzt wurden, in den Transrepressionsexperimenten eingesetzt. All diese Chimären reprimierten die TPA-induzierte Expression des Reporterkonstrukts ähnlich gut wie der Wildtyp-AR (Abb. 14, relative Transrepression, vergleiche ARwt mit den chimären Rezeptoren AR Δ 473/NF1X3, AR Δ 510/NF1X3 und AR Δ 536/NF1X3). Daß sogar der chimäre Rezeptor AR Δ 536/NF1X3 wieder in der Lage war Hemmung zu vermitteln unterstützt die Annahme, daß für die Transrepression keine spezifischen Bereiche des N-Terminus benötigt werden. Ein weiterer Hinweis auf einen unspezifischen Beitrag des N-terminus zur Transrepression, zeigen Experimente mit AR Δ 536, AR Δ 536/NF1X3 und einer Mutante bei der die Hormonbindungsdomäne deletiert ist, die in ihrer reprimierenden Aktivität auf das, auch durch das Onkoprotein ERM induzierbare Reporterkonstrukt -517/+63 Coll-Luc untersucht wurden (Gast et al, 1998, im Druck). In diesen Experimenten wurde gezeigt, daß AR Δ 536 keine reprimierende Aktivität auf die onkoprotein-induzierte Expression besitzt, jedoch AR Δ 536/NF1X3 wieder reprimieren konnte und daß die HBD des AR nicht für die Repression benötigt wird, sondern nur der N-Terminus und die DBD.

Alle Ergebnisse zusammengenommen lassen vermuten, daß die AR vermittelte reprimierende Wirkung der Androgene (zumindest in Bezug auf die Kollagenaseaktivität) nicht auf spezifische N-terminale Sequenzen angewiesen ist.

Die Befunde aus 2.2.1 und 2.2.2 zeigen, daß der N-Terminus des menschlichen Androgenrezeptors eine wichtigere Funktion als bisher beschrieben wurde besitzt. Er vermittelt DNA-Bindung-, Transaktivierungs- und Transrepressionseigenschaften. Für die transaktivierende Funktion des N-Terminus werden spezifische Bereiche benötigt, wohingegen für DNA-Bindung und Transrepression keine bestimmten Aminosäuren gebraucht werden, sondern eine gewisse Länge des N-Terminus vorhanden sein muß, um eine bestimmte Struktur aufrechtzuerhalten. Es konnte keine Trennung der transaktivierenden von transreprimierenden Eigenschaften des N-Terminus des Androgenrezeptors erreicht werden.

In einem Bereich des Androgenrezeptors mit solch wichtigen Funktionen wie der N-Terminus, können natürlich vorkommende Mutationen einen schwerwiegenden Effekt auf die Aktivität des Rezeptors ausüben. Um die Bedeutung dieser Aussage zu unterlegen, wurde eine natürlich vorkommende Mutation, die bei einem Patienten mit Reifensteinsyndrom gefunden wurde, analysiert und deren Effekt auf die Funktion des Androgenrezeptors bestimmt.

2.2.3 Eine natürlich vorkommende N-terminale Mutation (G474E) im Androgenrezeptor

In der vorliegenden Dissertation wurde eine neu entdeckte Mutante des Androgenrezeptors, die bei einem Patienten mit klinischen Symptomen, die denen des Reifensteinsyndroms ähneln, charakterisiert. Der Patient wurde von C. Radmayr und H. Klocker von der Universitätsklinik für Urologie in Innsbruck, Österreich, untersucht. Der Patient wurde im August 1993 geboren und wies folgende Symptome auf: Das genetische Geschlecht zeigte den männlichen Karyotyp 46XY, er besaß einen Mikropenis, die Harnröhre mündete zwischen Penis und Hodensack (perineoskrotale Hypospadie), der Penis war gekrümmt, die Hoden lagen in der Leiste (Kryptorchismus) und der Hodensack (Skrotum) war verkümmert. Die spezifische Androgenbindung, die in Genitalhautfibroblasten des Patienten gemessen wurde, war deutlich verringert ($B_{max}=1,9$ fMol/1 mMill. Zellen, normal >5 fMol/1 Mill. Zellen), bei einer normalen Affinität ($KD=0,2$). Der Patient wurde einer androgenen Stimulationstherapie unterzogen, wodurch sich nach einem Jahr die Spezifische Androgenbindung wieder normalisierte. Anfang 1996 wurde eine chirurgische Korrektur vorgenommen, die eine Penisbegradigung, einen Harnröhrenaufbau und eine beidseitige Plazierung der Hoden im Skrotum (Orchidopexie) einschloß.

Bei Untersuchungen des Androgenrezeptorgens dieses Patienten wurde eine Punktmutation gefunden, die einen Nukleotidaustausch an Position 1786 von Guanin zu Adenin verursachte, was zu einem Aminosäureaustausch im N-terminalen Bereich des Androgenrezeptors an Position 474 von Glyzin (G) zu Glutaminsäure (E) führt.

Die Mutation wurde in einen Expressionsvektor eingeführt, der zusammen mit Genitalhautfibroblasten (GHF) des Patienten und von Kontrollpersonen, von H. Klocker zur Verfügung gestellt wurde.

Die Mutation verursacht keine Stop-Kodon-verursachende Leserastermutation. Es kann deshalb vermutet werden, daß ein komplettes Androgenrezeptorprotein exprimiert wird. Da die Messungen der spezifischen Androgenbindung in Genitalhautfibroblasten des Patienten erniedrigte Werte ergab, die Affinität zum Liganden aber den Normalwerten entsprach, ist jedoch auch zu vermuten, daß in den Zellen weniger Protein vorhanden ist.

Als erstes wurde deshalb die Proteinmenge in den Genitalhautfibroblasten des Patienten untersucht.

2.2.4 Genitalhautfibroblasten des Patienten mit partieller Androgeninsensitivität enthalten weniger Rezeptorprotein und AR-mRNA

Genitalhautfibroblasten (GHF) des Patienten mit der N-terminalen Mutation G474E, vor und nach einer einjährigen Androgentherapie und GHFs von zwei Kontrollpersonen wurden 48 Stunden mit DHT (oder dem Lösungsmittel 80% Äthanol als Kontrolle) behandelt, und danach in Laemmli-Probenpuffer geerntet. Nach Aufbrechen der Zellen durch Sonifikation wurden die gleichen Mengen Extrakt durch Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulphat*)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und über Nacht auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran geblottet. Der Androgenrezeptor wurde mit dem AR-spezifischen Antikörper F39.4.1 nachgewiesen.

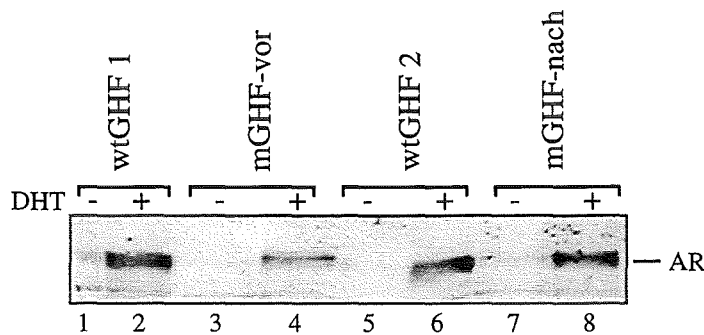


Abb 15: Die Menge an AR-Protein ist in GHFs des Patienten (vor der Androgentherapie) erniedrigt. Immunoblot von GHFs des Patienten vor und nach einer einjährigen Androgentherapie und GHFs aus zwei Kontrollpersonen. Jeweils 10^6 Zellen wurden auf Petrischalen ausgesät und 48 h mit DHT oder dem Lösungsmittel behandelt. Die Zellen wurden mit Laemmli-Probenpuffer (80 mM Tris pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% Glycerin, 2% β -Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) geerntet und jeweils 60 μ l der Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Membran wurde mit dem Androgenrezeptor-spezifischen Antikörper F39.4.1 und danach mit einem Merretichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper inkubiert. Die Detektion des AR-Proteins erfolgte durch eine Peroxidase-reaktion.

Die Inkubation mit DHT stabilisiert das Androgenrezeptorprotein auch in Genitalhautfibroblasten (Abb. 15, vergleiche jeweils -/+ DHT). Die Menge an Protein ist in Genitalhautfibroblasten des Patienten, vor der Androgentherapie, im Vergleich zu den zwei Proben aus Kontrollpersonen (GHF 1 u. 2), trotz Stabilisierung durch DHT reduziert (Abb 15, vergleiche 4 mit 2 u. 6). Genitalhautfibroblasten, die nach der Hormonbehandlung entnommen wurden, zeigen in Anwesenheit von DHT wieder einen normalisierten Wert der Proteinmenge (Abb 15, vergleiche die Spur 8 mit 2 u. 6).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Menge an Androgenrezeptorprotein in Genitalhautfibroblasten des Patienten vor einer einjährigen androgenen Stimulationstherapie verringert ist, sich aber auch, wie im Falle der Kontrollpersonen, durch DHT (100nM) stabilisieren läßt. Warum sich die Menge nach der einjährigen Hormonbehandlung wieder normalisierte kann im Moment

nicht beantwortet werden. Es ist zu vermuten, daß während dieser langen Zeit der Behandlung, einschneidende Veränderungen in der Zelle stattgefunden haben.

Um zu untersuchen ob sich diese Reduktion der Proteinmenge auch bei physiologischen Hormonkonzentrationen auswirkt, wurden Genitalhautfibroblasten des Patienten vor der Hormonbehandlung und GHFs einer Kontrollperson mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-10} - 10^{-7} M) DHT für 48 Stunden inkubiert. Physiologische Hormonkonzentrationen im Serum von Männern liegen bei Werten >10 nM (Kaspar, 1992, Dissertation, Vermeulen und Verdonck, 1992). Der Nachweis der Rezeptorproteine erfolgte mittels *Western-Blot*-Technik.

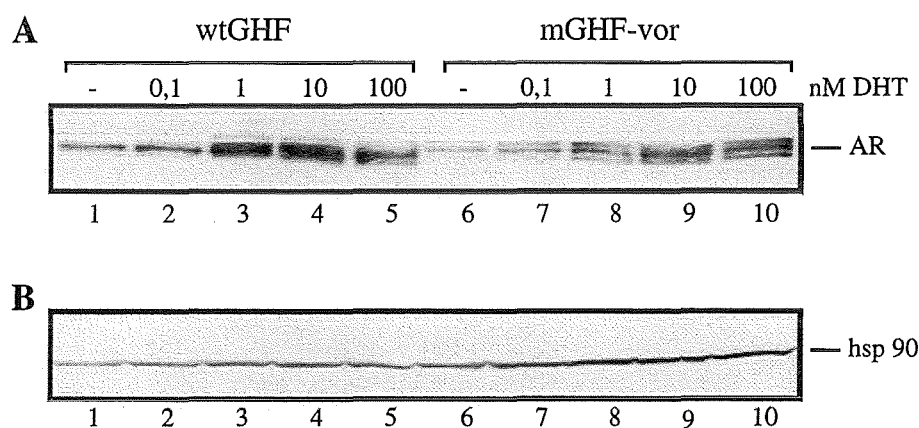


Abb 16: Verminderte Mengen an AR-Protein in GHFs bei physiologischen DHT-Konzentrationen. A) Western-Blot-Analyse von GHFs des Patienten vor der einjährigen Androgentherapie (mGHF-vor) und GHFs einer Kontrollperson (wtGHF). Jeweils 10^6 Zellen wurden auf Petrischalen ausgesät und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an DHT (0-100 nM) behandelt. Die Zellen wurden mit Laemmli-Probenpuffer abgeschabt und jeweils 60 μ l der Proben auf ein SDS-Proteingel aufgetragen und aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran geblottet und anschließend mit dem AR-spezifischen Antikörper F39.4.1 und danach mit einem Merretichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper inkubiert. Durch eine Peroxidase-reaktion konnten die Proteine nachgewiesen werden. B) Nachweis des Hitzeschockproteins hsp 90 als Ladekontrolle.

In Abbildung 16 ist zu sehen, daß die Proteinmenge in Genitalhautfibroblasten des Patienten, im Vergleich zur Kontrolle, bei physiologisch wirksamen Hormonkonzentrationen von 0,1, 1,0 und 10,0 nM DHT drastisch vermindert ist (Abb 16, vergleiche die Spuren 2, 3 u. 4 mit 7, 8 u. 9). Bei höheren Konzentrationen (100 nM DHT) ist dieser Effekt nicht mehr ganz so stark ausgeprägt (Abb 16, vergleiche die Spuren 5 mit 10). Diese Beobachtung bekommt noch mehr Gewicht, wenn man die Proteinmenge der Ladekontrolle anschaut, die zeigt, daß in den Spuren mit Extrakten der mGHFs etwas mehr aufgetragen wurde (Abb 16 B, vergleiche die Spuren 1-5 mit 6-10, hsp 90).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Menge an Rezeptorprotein in den GHFs des Patienten auch bei niedrigeren (physiologisch relevanten) Hormonkonzentrationen erniedrigt ist. Was ist der

Grund für eine niedrige Proteinmenge? Entweder das Protein ist instabil und wird in der Zelle stärker abgebaut, oder die Menge an Boten-RNA (*messenger* RNA, mRNA) wird durch die Mutation negativ beeinträchtigt.

Um zu untersuchen, ob in Zellen des Patienten mit dem mutierten AR die mRNA-Menge des Androgenrezeptors reduziert ist, wurden Genitalhautfibroblasten vom Patient und von Kontrollpersonen einer *Northern-Blot*-Analyse unterzogen. Da diese Zellen sehr wenig Androgenrezeptorprotein und mRNA exprimierten und nicht genügend Zellen für diese Analyse eingesetzt werden konnten, war es nicht möglich, die Androgenrezeptor-mRNA in diesen Zellen mit der *Northern-Blot*-Methode nachzuweisen. Es wurde die sensitivere Methode der Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) angewandt. Dabei wird die mRNA durch die Reverse Transkriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben, welche durch PCR mit spezifischen Primern amplifiziert werden kann.

Genitalhautfibroblasten des Patienten vor und nach einem Jahr androgener Stimulationstherapie, GHFs einer Kontrollperson und Prostatakarzinomzellen (LNCaP) als Androgenrezeptor-Kontrolle wurden auf Petrischalen ausgesät und 24 Stunden mit oder ohne DHT inkubiert. Aus den Zellen wurde RNA extrahiert und davon je 1 µg in der Reversen Transkriptionsreaktion eingesetzt. Als Negativkontrolle für den Nachweis von Verunreinigungen mit genomischer DNA, wurde die gleiche Reaktion ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Mit je einem Zehntel der Reaktion wurde anschließend eine PCR durchgeführt, wobei AR- und GAPDH-spezifische Primer in derselben Reaktion eingesetzt wurden. Die Primerkonzentration für die GAPDH-PCR und die AR-Primer wurde so gewählt, daß nach 25 Zyklen die Menge der Produkte noch im linearen Bereich lag, was einen semiquantitativen Vergleich erlaubt. Als weitere Kontrolle wurden die Primerpaare einzeln mit Expressionsvektoren von ARwt oder GAPDH angesetzt (Abb. 17 A, Spuren 12 u. 13, und B, Spuren 11 u. 12). Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt photographiert und mittels eines Rechnerprogramms für den PC (ONE-Dscan) semiquantitativ ausgewertet.

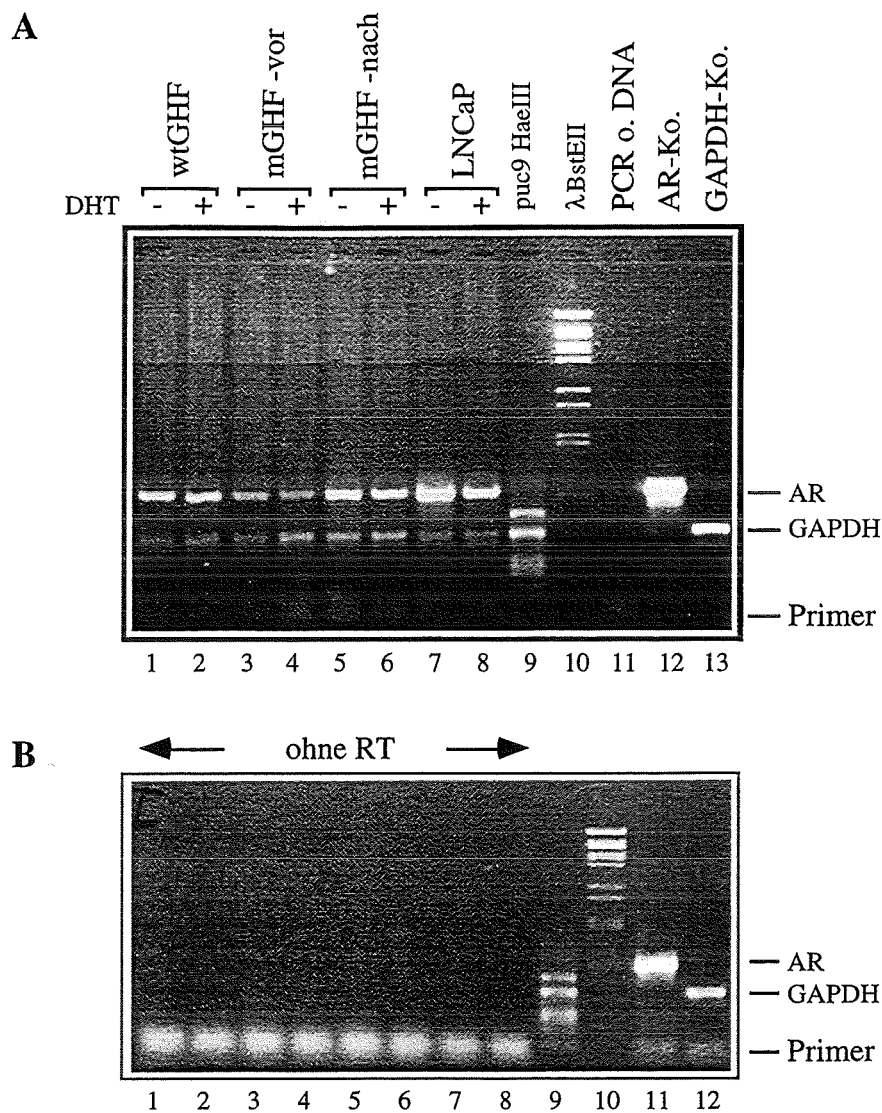


Abb 17: Genitalhautfibroblasten des Patienten mit dem mutierten AR-G474E zeigen eine verminderte Menge an AR-mRNA. A) Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) als Nachweis für die mRNA Menge in Genitalhautfibroblasten (GHF). B) Die gleiche Reaktion wie in A, ohne Reverse Transkriptase. Je 10^6 GHF-Zellen oder Prostatakarzinomzellen (LNCaP) wurden auf Petrischalen ausgesät und 24 h mit DHT (10^7 M) oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) behandelt. Nach Extraktion von Gesamt-RNA wurde mit je $1 \mu\text{g}$ RNA eine RT-Reaktion vorgenommen, wodurch komplementäre DNA (cDNA) erzeugt wird. Mit je $1 \mu\text{l}$ (aus $10 \mu\text{l}$) RT-Reaktion wurde eine PCR mit AR- und GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem Ethidiumbromid enthaltenden 1% Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und die Intensität der Banden mit Hilfe eines Rechnerprogramms (OneDscan) semiquantitativ gemessen. wt-GHF = GHF von Kontrollperson, GHF-vor u. GHF-nach = GHF vor und nach einem Jahr androgener Stimulationstherapie. AR-Ko. u. GAPDH-Ko. = Kontroll-PCR mit 1 ng ARwt- u. GAPDH-Expressionvektor. pUC9 HaeIII und λ BstEII sind DNA-Fragmentlängenmarker, die durch Verdau mit den angegebenen Enzymen HaeIII bzw. BstEII erhalten wurden.

Die Menge an PCR-Produkt der reversen Transkription von RNA aus Genitalhautfibroblasten des Patienten mit dem mutierten Androgenrezeptor vor der androgenen Stimulationstherapie ist in ihrem AR-spezifischen Signal deutlich schwächer im Vergleich zum Wildtypkontrollansatz

(Abb 17 A, vergleiche die Spuren 1 u. 2 mit 3 u. 4, AR), wobei die Menge des GAPDH-spezifischen Fragments ungefähr gleich zu sein scheint (Abb 17 A, vergleiche Spur 1 u. 2 mit 3 u. 4, GAPDH). Eine semiquantitative Auswertung erbrachte eine Reduktion von über 50%. Die Menge an PCR-Produkt im Ansatz mit den GHFs ist nach der Therapie wieder mit dem Normalwert vergleichbar (Abb 17 A, vergleiche Spuren 5 u. 6 mit 1 u. 2, AR). Die Rechneranalyse zeigte eine eher erhöhte Menge im Falle der GHFs nach der Behandlung. Die starke Intensität des Signals in den Spuren mit den LNCaP Zellen, kommt daher, daß diese Zellen große Mengen an Androgenrezeptor mRNA exprimieren (Abb. 17 A, Spuren 7 u. 8). Die Behandlung der Zellen mit DHT hatte keinen großen Einfluß auf die PCR-Produktmenge (Abb 17 A, vergleiche jeweils +/- DHT). Die Kontrollen mit den Expressionsplasmiden zeigen, daß die richtigen Fragmente amplifiziert wurden und ohne DNA keine Produkte gebildet wurden (Abb 17 A, Spuren 12 u. 13). Es konnten keine Verunreinigungen durch genomische DNA in der PCR nachgewiesen werden, obwohl die Reaktion mit Ansätzen ohne reverse Transkriptase (Abb. 17 B) erst nach 32 Zyklen gestoppt wurden, und die PCR in Abb. 17 A schon nach 25 Zyklen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß in Genitalhautfibroblasten des Patienten mit dem mutierten Androgenrezeptor (vor der Androgentherapie), eine geringere Menge an Androgenrezeptor-mRNA vorhanden ist. Warum sich nach einer einjährigen Androgentherapie auch die Werte der mRNA wieder normalisiert haben, kann im Moment nicht beantwortet werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die verminderte Menge an Rezeptorprotein in Genitalhautfibroblasten des Patienten mit Reifensteinsyndrom auf eine reduzierte Menge an Androgenrezeptor mRNA zurückzuführen ist. Die Stabilisierung der Proteinmenge durch eine 48 stündige Hormonbehandlung, konnte nicht in einer Stabilisierung der mutierten mRNA (nach 24 Stunden Hormonbehandlung) festgestellt werden.

Die nächste Frage war, ob die reduzierte Menge an mutierter AR mRNA von einer niedrigeren Transkriptionsaktivität herrührt, oder ob die mutierte mRNA instabil ist.

Eine Untersuchung der Stabilität der mutierten mRNA in Genitalhautfibroblasten hätte beispielsweise durch Messung der mRNA-Menge nach verschiedenen Zeitpunkten einer Inhibition der Transkription sein können. Diese Experimente konnten mit den GHF nicht durchgeführt werden, weil erstens die mRNA nur über die RT-PCR nachweisbar ist und zweitens nicht genügend Zellmaterial vorhanden war.

Für weitere Experimente wurde deshalb der mutierte Androgenrezeptor in ein Expressionsplasmid eingebaut und in transienten Experimenten untersucht.

Versuche, die Mutation stabil in eine andere Zelllinie einzubringen, um mehr Zellmaterial und damit auch mehr RNA zur Verfügung zu haben schlugen fehl, weil weder das mutierte Protein noch die mRNA in potentiellen Zellklonen meßbar waren.

Untersuchung der Proteinmenge in transienten Experimenten mit verschiedenen Expressionsplasmiden des mutierten Rezeptors, im Vergleich zum Wildtyp-AR, könnten zeigen, daß die Verringerung der Protein- und mRNA-Menge nicht von einer promotorbedingten, geringeren Transkriptionsaktivität abhängt.

2.2.5 Auch in transienten Experimenten führt die Mutation G474E zu reduzierten Mengen an Rezeptorprotein

Der mutierte Androgenrezeptor aus dem Patienten mit Reifensteinsyndrom wurde in zwei verschiedene Expressionsvektoren (pSG5 u. pcDNA3) mit verschiedenen Promotoren, SV40 (Promotor des *simian virus 40 large T-antigen*) und CMV (Cytomegalovirus), eingebaut.

Für die Untersuchung der Proteinmenge wurden Cos-7 Zellen durch Elektroporation mit den zwei verschiedenen Expressionsplasmiden des mutierten Rezeptors AR-G474E, dem Wildtyp-AR Expressionplasmid und einem leeren Kontrollvektor transient transfiziert, mit oder ohne DHT behandelt und nach 48 h geerntet. Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, einer *Westernblot*-analyse unterzogen und durch Androgenrezeptor-spezifische Antikörper nachgewiesen.

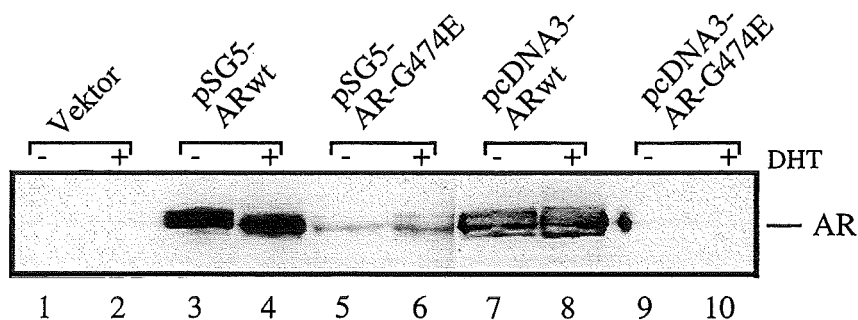


Abb. 18: Verminderte Proteinmenge des mutierten Androgenrezeptors in transienten Transfektionen. Immunoblot mit 20 µg des Gesamtzell-extraktes aus transient transfizierten Cos-7 Zellen. Je 2×10^6 Cos-7 Zellen wurden mit je 15 µg Expressionsvektor ohne cDNA, Wildtyp-AR (pSG5-ARwt, pcDNA3-ARwt) und Expressionsvektoren mit mutiertem Rezeptor (pSG5-AR-G474E u. pcDNA3-AR-G474E) transient durch Elektroporation transfiziert, 48 h mit Hormon oder dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und dann geerntet. Die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nylonmembran geblotet, anschließend mit dem Anti-AR Antikörper SPO61 inkubiert und mit Hilfe des *enhanced chemilumineszens* (ECL)-Systems detektiert. Die Größe des AR ist angegeben.

In den Spuren mit Extrakten aus Cos-7 Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, kann weder in Ab- noch in Anwesenheit von Hormon (DHT), Androgenrezeptorprotein nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 1 u. 2). Extrakte aus Zellen, die mit den Wildtyp-AR

Expressionsvektoren pSG5-ARwt oder pcDNA3-ARwt transfiziert wurden, zeigen in beiden Fällen genügende Mengen an Rezeptorprotein, wobei in diesem Experiment keine Stabilisierung durch DHT festgestellt werden kann (Abb. 18, vergleiche Spuren 3 mit 4, und 7 mit 8). Die Stabilisierung durch Hormon konnte in den meisten Experimenten, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, beobachtet werden. Der Grund warum dies hier nicht der Fall war ist unklar. Wie deutlich zu sehen ist, enthielten Extrakte aus Cos-7 Zellen, die mit den verschiedenen Expressionvektoren des mutierten Androgenrezeptors transfiziert wurden, sehr viel weniger, oder keine meßbaren Mengen an Rezeptorprotein im Vergleich zum Wildtyp-AR (Abb. 18, vergleiche die Spuren 3 u. 4 mit 5 u. 6, und die Spuren 7 u. 8 mit 9 u. 10). Die Behandlung mit DHT hatte nur einen leichten stabilisierenden Effekt im Ansatz mit dem Plasmid pSG5-AR-G474E (Abb 18, vergleiche Spur 5 mit 6). Das „kleine“ Signal in Spur 9 wurde durch einen Fehler beim Beladen der Gelspur 8 verursacht.

Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde aus den Proteinanalysen mit den Genitalhautfibroblasten (GHF) (2.2.4), die zeigten, daß die Menge an Androgenrezeptorprotein in den GHFs des Patienten mit dem mutierten Androgenrezeptor, verringert waren. Weiterhin zeigen dieses und das GHF-Experiment, daß die verminderte Expression des mutierten Rezeptors kein transkriptioneller Effekt ist, da mit beiden verwendeten Expressionplasmiden, die sich durch verschiedene Promotoren unterscheiden und mit dem menschlichen AR-Genpromotor in den Genitalhautfibroblasten des Patienten, wenige oder keine meßbaren Mengen an mutiertem Androgenrezeptor erhalten wurde.

Eine weitere Frage war nun, ob diese wenigen Mengen an mutiertem Rezeptorprotein funktionell aktiv sind. Um dies zu untersuchen, wurden der mutierte Androgenrezeptor in transienten Transaktivierungs- Transreprimierungs- und Gelretardationsanalysen untersucht.

2.2.6 Die Mutation G474E führt zu einem inaktiven Androgenrezeptor in Transaktivierungs- Transreprimierungs- und Gelretardationsanalysen

Zunächst wurden Transaktivierungs- und Transrepressionsaktivität von AR-G474E mit dem Wildtyp-AR verglichen. Dazu wurden CV-1 Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode transient mit den entsprechenden Expressionsvektoren und mit MMTV-Luc oder -517/+63 Coll-Luc als Reportergene transfiziert. Nach 40 Stunden Hormonbehandlung mit DHT (im Falle der Transrepression zusammen mit TPA) wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität gemessen.

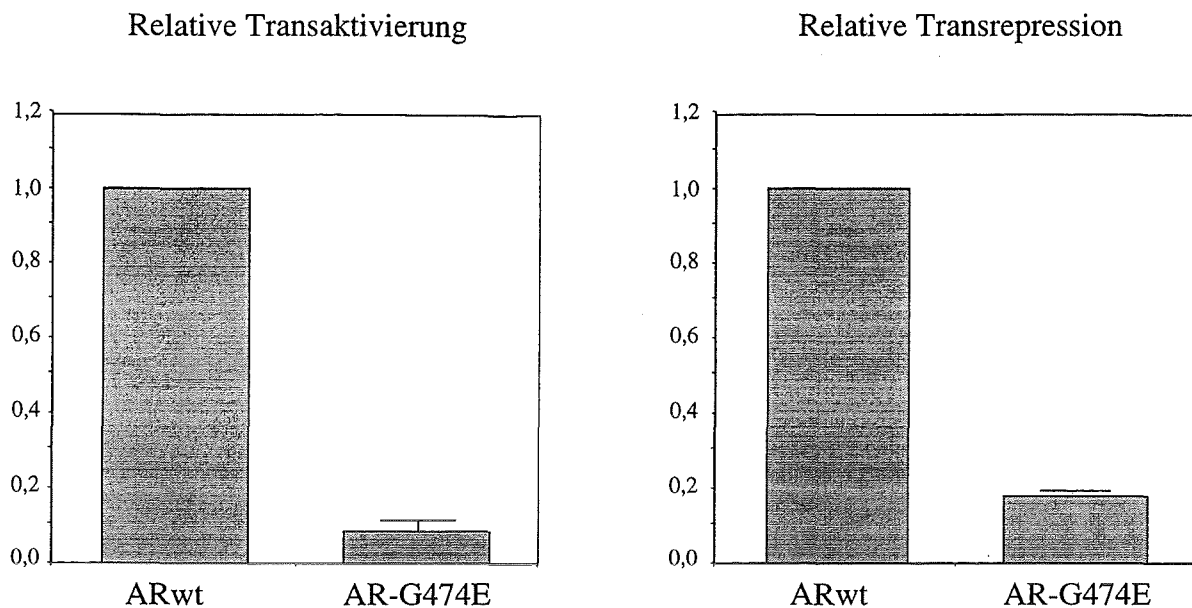


Abb. 19 : Relative Transaktivierung und Transrepression der Mutante AR-G474E im Vergleich zum Wildtyp-AR. Jeweils 1 μ g leerer Expressionsvektor oder Expressionsplasmide vom Wildtyp-AR oder der Mutante AR-G474E wurden mit je 9 μ g Reporterplasmid (MMTV-Luc, im Falle der Transaktivierung oder -517/+63 Coll-Luc, im Falle der Transrepression) nach der Kalziumphosphat-Methode transient transfiziert. Nach 6 h wurde ein Glycerinschock durchgeführt und die Zellen anschließend mit DHT (im Falle der Transrepression gleichzeitig mit TPA) behandelt. Nach 40 h wurden die Zellen geerntet und die gleiche Menge an Proteinextrakt zur Luziferaseaktivitätsmessung eingesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten. Der Wert des Wildtyp-AR wurde 1,0 gesetzt und die anderen Werte relativ dazu errechnet.

Der mutierte Rezeptor zeigt eine über 90%ige Reduktion in der Transaktivierung des MMTV-Luziferasereporterkonstrukts im Vergleich zum Wildtyp-AR (Abb. 19, links). Auch die Fähigkeit der Repression eines Phorbolster-induzierten Kollagenasepromotorkonstruktes ist durch die Mutation um über 80% inhibiert (Abb. 19, rechts).

Für die Untersuchung der DNA-Bindung wurden Cos-7 Zellen durch Elektroporation mit den Expressionsplasmiden der Rezeptoren transient transfiziert, mit oder ohne DHT behandelt und nach 48 h geerntet. Mit Gesamtzellextrakten aus diesen Zellen wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt und die Proteine in der *Westernblot*-analyse nachgewiesen.

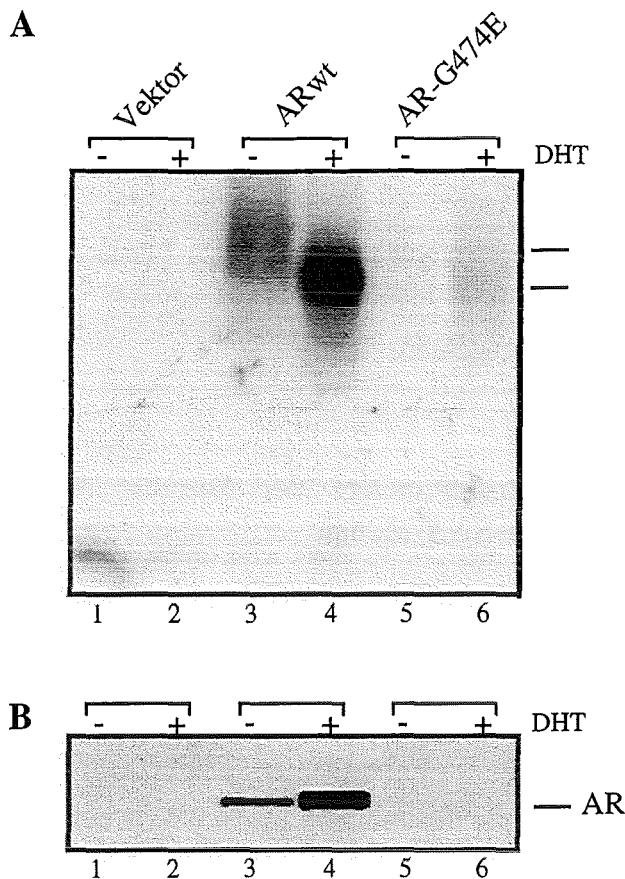


Abb. 20: Verminderte DNA-Bindung der Mutante AR-G474E infolge geringerer Synthese des Rezeptorproteins. A) Gelretardationsanalyse mit Wildtyp-AR und der Mutante AR-G474E. Je 20 μ g Protein eines Gesamtzellextrakts aus Cos-7 Zellen, die mit je 15 μ g Expressionsplasmid Wildtyp-AR, der AR-G474E Mutante oder einem Leervektor elektroporiert wurden, sind zuerst 10 min mit 1 μ g poly(dI/dC) auf Eis, dann 20 min mit radioaktiv markiertem ARE-Oligonukleotid (20.000cpm, 2fmol) bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die Komplexe wurden sodann auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert. B) Immunoblot mit 20 μ g des Gesamtzellextraktes aus A. Die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nylonmembran geblottet, anschließend mit dem Anti-AR Antikörper SPO61 inkubiert und mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Die Größe des AR ist angegeben.

Extrakte aus Cos-7 Zellen, die mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden, zeigten weder in Ab- noch in Anwesenheit von Hormon DNA-Bindung (Abb. 20, Spuren 1 u. 2). Wie deutlich zu sehen ist, ist die DNA-Bindung der Mutante AR-G474E in An- und Abwesenheit von Hormon gegenüber dem Wildtyp-AR stark reduziert, bzw. fast nicht mehr nachweisbar (Abb 20 A, vergleiche jeweils die Spuren 3 mit 5 und 4 mit 6). Die Bindung des Liganden (DHT) führt in beiden Fällen zu einer Stabilisierung der DNA-Bindung und zu einer weiteren Retardation im Laufverhalten des DNA-Rezeptorkomplexes (Abb. 20 A, vergleiche die DNA-Bindungsintensität der Spuren 3 mit 4 und 5 mit 6). Es ist auch deutlich zu erkennen, daß die Hormonbehandlung das ARwt-Protein stabilisiert, im Falle der Mutante konnte der Effekt nicht nachgewiesen werden, da keine detektierbaren Proteinmengen vorhanden waren. (Abb 20 B, vergleiche Spuren 3 mit 4 und 5 mit 6).

Es gibt einige Unterschiede zwischen transfizierten Zellen und Genitalhautfibroblasten:

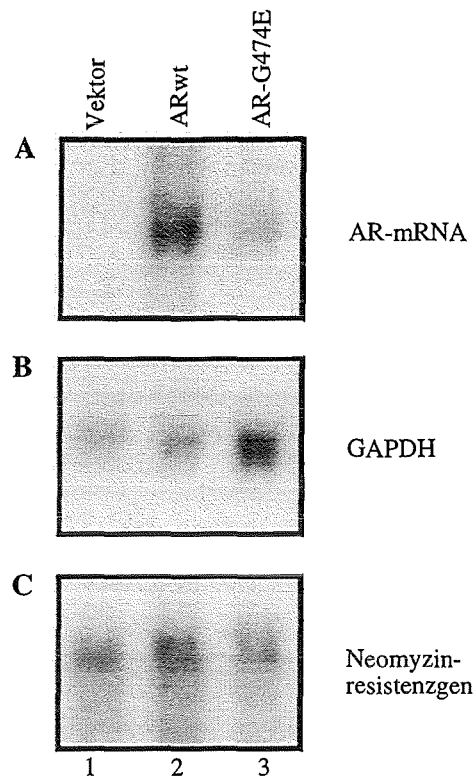
(i) in den transfizierten Cos-7 Zellen ist die Stabilisierung der Rezeptormenge durch DHT nicht so effektiv wie in den Genitalhautfibroblasten; (ii) die Proteinmenge des mutierten Androgenrezeptors ist in transfizierten Cos-7 Zellen kaum nachweisbar, woraus zu schließen ist, daß in diesen Zellen eine drastische Reprimierung des mutierten Rezeptors stattfindet.

Um herauszufinden, ob die Reprimierung schon auf der Ebene der mRNA stattfindet, wie im Falle der Genitalhautfibroblasten, wurden RNA-Analysen (*northern blot analysis*) mit transfizierten Cos-7 Zellen durchgeführt.

2.2.7 Die verminderte Proteinmenge der Mutante AR-G474E resultiert aus einer geringeren m-RNA-Menge

Um die Expression des Androgenrezeptorgens zu untersuchen, wurde mRNA aus Cos-7 Zellen gewonnen. Diese wurden genauso wie für die Extraktion von Zellextrakten durch Elektroporation mit leerem Vektor und Expressionsvektoren mit Wildtyp-AR und der Mutante AR-G474E transient transfiziert. Zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz wurde die gleiche Menge eines Plasmids, das für ein Resistenzgen gegen Neomycin kodiert, kotransfiziert. Nach 48 Stunden Hormonbehandlung wurde poly A⁺ RNA extrahiert und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Nylonmembran transfiziert (geblottet) und mit spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten für die einzelnen nachzuweisenden RNAs hybridisiert. Durch die Hybridisierung mit einem Fragment das die mRNA der GAPDH erkennt, kann die Menge an geladener RNA verglichen werden. Durch Autoradiographie konnte die RNA detektiert und mit Hilfe einer Biobild-Analysator (Fuji) quantifiziert werden.

Abb 21: Verminderte mRNA-Menge der Mutante AR-G474E in transient transfizierten Cos-7 Zellen. Northern-Blot-Analyse transient transfizierter Cos-7 Zellen. Cos-7 Zellen wurden mit je 15 µg Vektor-, ARwt- und AR-G474E-Expressionsplasmid und jeweils 15 µg Expressionsplasmid, welches das Neomycinresistenzgen exprimiert als Elektroporationskontrolle kotransfiziert. Nach 48 h Induktion durch DHT wurden die Zellen geerntet, die poly A⁺ mRNA extrahiert und an Oligo-dT-Zellulose gebunden. Nach mehreren Waschungen wurde die mRNA eluiert und 20 µg auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die mRNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mittels UV-Licht kovalent an die Membran fixiert. Sodann erfolgte eine Hybridisierung mit einem für die gesuchte mRNA spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Fragment. Für weitere Hybridisierungen konnte durch Kochen die ältere Sonde entfernt werden. A) Hybridisierung mit einem für den Androgenrezeptor spezifischen DNA-Fragment. B) Detektion der mRNA der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), deren Menge durch die Behandlung nicht verändert wird, erkennt. C) Kontrolle der Elektroporationseffizienz durch Hybridisierung mit einem DNA-Fragment, das die mRNA des kotransfizierten Neomycinresistenzgen erkennt.



Wie deutlich zu sehen ist, war in dem Extrakt von Cos-7 Zellen, die mit der Mutante AR-G474E transfiziert wurden, weniger AR-mRNA enthalten als in Wildtyp-AR transfizierten Zellen (Abb 21 A, vergleiche Spur 2 mit 3), obwohl mehr mRNA geladen wurde (Abb 21 B, vergleiche Spur 2 u. 3). Die Elektroporationseffizienz beim Ansatz mit der Mutante war zwar etwas schlechter als im Vergleich zum Wildtyp-AR (Abb. 21 C, vergleiche Spur 2 u. 3), aber eine Quantifizierung der Intensität der Banden ergab eine etwa 50%ige Reduktion der mRNA-Menge im Falle des mutierten AR-G474E. In Leervektor-transfizierten Zellen war keine AR-mRNA nachzuweisen (Abb. 21 A, Spur 1).

Die reduzierte Menge an AR-G474E-mRNA in transienten Transfektionsexperimenten ist demnach zumindest ein Grund für eine verminderte Menge an Protein, im Vergleich zum Wildtyp-AR. Obwohl die mRNA-Menge nur um etwa 50% reduziert ist, war die Menge an Protein um ca. 90-95% reduziert. Daraus kann geschlossen werden, daß eine weitere Reprimierung auf Proteinebene stattfindet.

Die Experimente zeigten bis jetzt, daß sowohl die Proteinmenge, als auch die mRNA Menge des mutierten Androgenrezeptors vom Patienten mit Reifensteinsyndrom in Genitalhautfibroblasten des Patienten und im transienten System, reduziert ist. Die Tatsache, daß das endogene Gen und die transfizierten Expressionsvektoren beide Reduktion der mRNA-Menge zeigen, ist nicht auf transkriptionelle Reprimierung zurückzuführen, sondern auf einen Effekt auf die mRNA. Eine Möglichkeit der Verringerung der mRNA-Menge könnte darin

liegen, daß die neusynthetisierte mutierte mRNA durch Proteine spezifisch erkannt wird, und dies eine Degradation der mutierten mRNA zur Folge hat.

Um zu untersuchen ob die Mutation dazu führt, daß die mRNA von spezifischen Proteinen erkannt wird, wurden RNA-Gelretardationsanalysen durchgeführt, die ähnlich wie DNA-Gelretardationen, die Interaktion von Proteinen mit RNA zeigen.

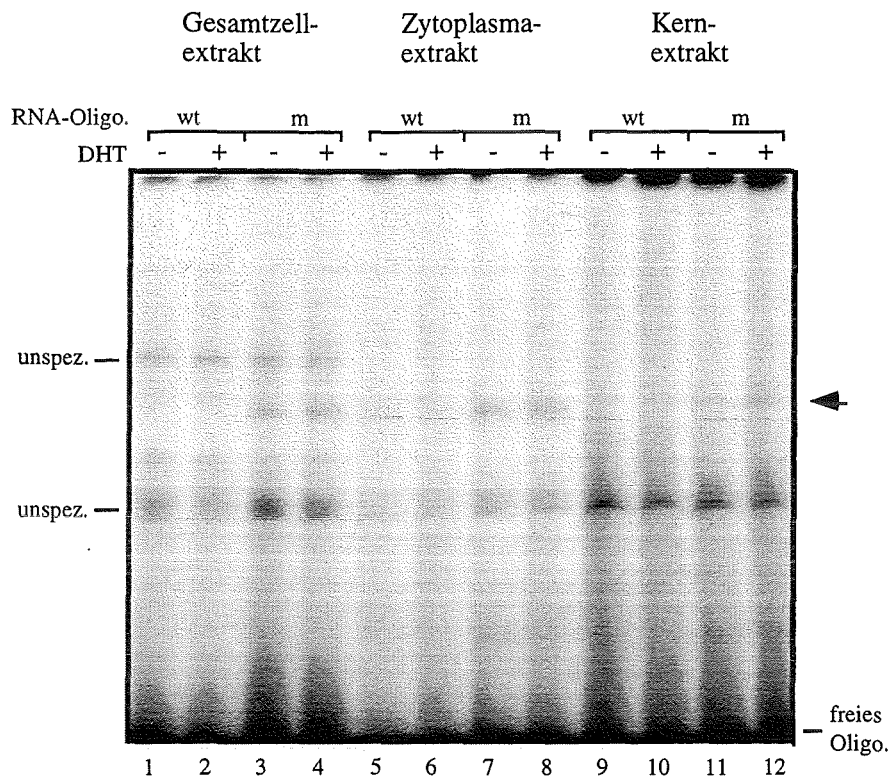
2.2.8 Eine Sequenz der mutierten AR-mRNA des Patienten mit partieller Androgeninsensitivität bildet spezifische RNA-Protein-Komplexe mit Extrakten von Cos-7 Zellen und Genitalhautfibroblasten

In den folgenden Experimenten wurden Proteinextrakte von Cos-7 Zellen, Genitalhautfibroblasten und Retikulozytenlysate in RNA-Protein-Interaktionsanalysen (RNA-Band Shift) untersucht.

Dazu wurden Oligonukleotide mit einer Sequenz von 31 Nukleotiden der mRNA des N-Terminalen Bereichs vom Wildtyp-Androgenrezeptor und der Mutante AR-G474E, die die Position der Mutation überspannt, synthetisch hergestellt (Eurogentec, Frankreich) und radioaktiv markiert.

Im ersten Experiment wurden je 2×10^6 Cos-7 Zellen für 48 Stunden mit DHT oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) als Kontrolle inkubiert. Die Zellen wurden dann geerntet und Gesamtzellextrakte, zytoplasmatische Extrakte und Kernextrakte präpariert. Jeweils die gleichen Mengen an Protein wurden zuerst mit poly d(I/dC) und danach mit radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotiden inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden dann auf einem 4%igem Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert.

Abb 22: Spezifische Bindung von Protein an die mutierte mRNA. RNA-Gelretardationsexperiment zum Nachweis von RNA bindenden Proteinen. 2×10^6 Cos-7 Zellen wurden auf Petrischalen ausgesät und für 24 h mit DHT (10^7 M) oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) behandelt. Die Zellen wurden dann geerntet und entweder Zell-, Zytoplasma- oder Kernextrakte präpariert. Je 100 µg Proteinextrakt wurden zuerst auf Eis 10 min mit 1 µg poly(dI/dC), dann 20 min mit radioaktiv markiertem Wildtyp (wt) oder mutiertem (m) Oligonukleotid (100.000cpm, 20fmol) bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden dann auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Oligo. = Oligonukleotide. Der Pfeil markiert den spezifischen Komplex zwischen Protein und mutiertem RNA-Oligonukleotid.



Gesamtzellextrakte von Cos-7 Zellen bilden in An- und Abwesenheit von Hormon mit dem mutierten RNA-Oligonukleotid spezifische Komplexe, welche eine Retardierung im Laufverhalten des freien Oligonukleotids verursachen (Abb 22, Spuren 3 u. 4, Pfeil). Mit Wildtyp-RNA-Oligonukleotiden bilden weder Gesamtzellextrakte noch zytoplasmatische- oder Kernextrakte solche spezifischen Komplexe (Abb 22, Spuren 1 u. 2, 5 u. 6 und 9 u. 10, Pfeil). Die hauptsächliche Menge dieser spezifischen Proteine oder dieses spezifischen Proteins, das die mutierten RNA-Oligonukleotide erkennt, scheint im Zytoplasma lokalisiert zu sein, da das Signal des Komplexes mit zytoplasmatischem Extrakt viel stärker ist, als mit Kernextrakt, bei dem eine Kontamination mit zytoplasmatischem Extrakt nicht auszuschließen ist (Abb 22, vergleiche die Spuren 7 u. 8 mit 11 u. 12).

Die Mutation im RNA-Oligonukleotid des menschlichen Androgenrezeptors aus dem Patienten mit partieller Androgeninsensitivität (Reifenstein) kann von Proteinen aus Cos-7 Zellen, die auch in den transienten Experimenten verwendet wurden, wo eine Reduktion des mutierten Androgenrezeptorproteins und der mRNA festgestellt wurde, erkannt und die mutierte RNA gebunden werden. Wenn diese Bindung spezifisch für die Mutation ist, so sollte es möglich sein, die Interaktion der Proteine mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid durch einen Überschuss an nicht markiertem Oligonukleotid zu kompetitieren. Diese Annahme wurde im nächsten Experiment überprüft, bei dem Cos-7 Zellen verwendet wurden, weil diese erstens ein

stärkeres Signal des RNA-Protein-Komplexes erzeugen und zweitens mehr Zellmaterial davon zur Verfügung stand.

Cos-7-Gesamtzellextrakt wurde zuerst 10 min mit poly(dI/dC) und einem 100 fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Wildtyp- oder mutiertem Oligonukleotid inkubiert. Danach wurde für weitere 20 min radioaktiv markiertes Oligonukleotid zugegeben. Die Reaktionen wurden auf einem Acrylamidgel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert.

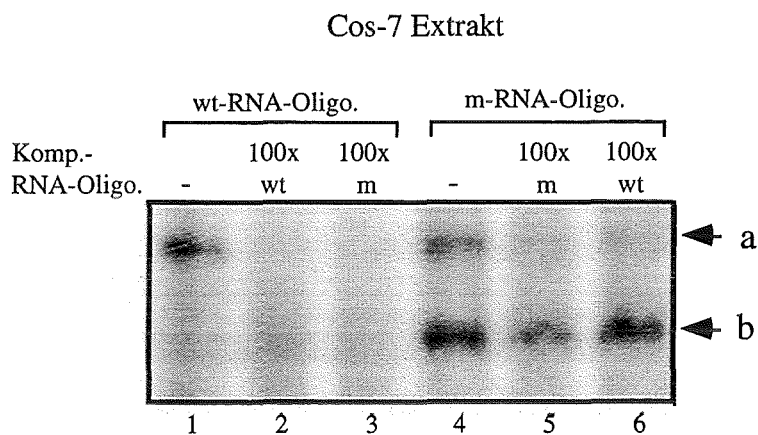


Abb 23: Die Bindung an die mutierten RNA-Oligonukleotide läßt sich spezifisch kompetitieren. Kompetitions-RNA-Gelretardationsanalyse zum Nachweis spezifischer Bindung an die mutierten Oligonukleotide. Je 50 µg Gesamtzellextrakt aus Cos-7 Zellen wurden zuerst auf Eis 10 min mit 1 µg poly(dI/dC) und 100 fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Wildtyp (wt) oder mutiertem (m)-RNA-Oligonukleotid, dann 20 min mit radioaktiv markiertem RNA-Oligonukleotid (50.000cpm, 10fmol) bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden dann auf einem 3,5% Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Die Pfeile weisen auf die spezifischen (b) und unspezifischen (a) Protein-RNA-Komplexe. Komp-RNA-Oligo. = Kompetitions-RNA-Oligonukleotide.

Ohne kompetitierende Oligonukleotide bilden Gesamtzellextrakte aus Cos-7 Zellen mit beiden, mutiertem und nicht mutiertem radioaktiv markiertem RNA-Oligonukleotid, einen Komplex (Abb.23 Spuren 1 u. 4, a), der durch eine 100 fache Inkubation mit nicht markiertem Wildtyp-RNA-Oligonukleotid oder mutiertem Oligonukleotid kompetitiert werden kann (Abb 23, vergleiche die Spur 1 mit 2 u. 3, und die Spur 4 mit 5 u. 6, a). Der Komplex, der durch Bindung von Protein an die mutierten radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotide entsteht (Abb. 23, Spuren 4, 5 u. 6, b), kann durch einen 100 fachen Überschuß an nichtmarkiertem, mutiertem RNA-Oligonukleotid zum Teil kompetitiert werden, nicht aber durch einen Überschuß an unmarkierten Wildtyp-RNA-Oligonukleotid (Abb 23, vergleiche die Spur 4 mit den Spuren 5 u. 6, a).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Bindung von Protein aus Cos-7 Zellextrakten an die mutierten RNA-Oligonukleotide spezifisch ist, da sie nicht durch einen Überschuß an nicht markierten Wildtyp-RNA-Oligonukleotiden, welche sich nur durch einem Nukleotidaustausch

unterscheiden, kompetitiert werden kann. Die Bindung kann jedoch zum Teil durch mutierte nicht-radioaktive RNA kompetitiert werden.

Die Mutation im RNA-Oligonukleotid scheint zu einer Strukturveränderung zu führen, welche spezifisch von Protein(en) aus Cos-7 Zellen erkannt wird. Ob dies auch für Genitalhautfibroblasten zutrifft, wurde im nächsten Experiment untersucht.

Jeweils 10^6 Cos-7 Zellen, Genitalhautfibroblasten von dem Patienten mit partieller Androgeninsensitivität und einer Kontrollperson wurden in Petrischalen ausgesät und für 40 Stunden mit DHT oder dem Lösungsmittel behandelt und danach geerntet. Mit je 50 μ g Zellextrakt und je 20 fmol Wildtyp oder mutiertem radioaktiv markiertem RNA-Oligonukleotid wurde eine RNA-Gelretardationsanalyse durchgeführt.

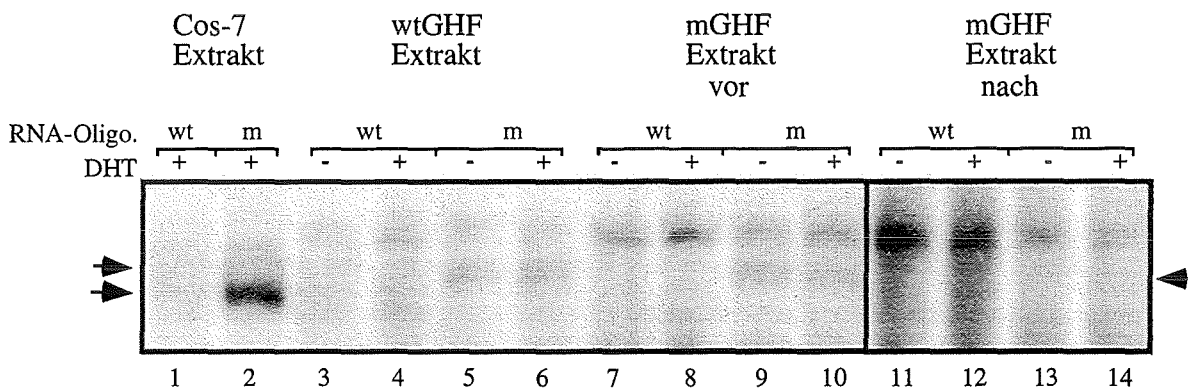


Abb 24: Proteine aus Genitalhautfibroblasten binden spezifisch an das mutierte RNA-Oligonukleotid. RNA-Gelretardationsexperiment zum Nachweis von RNA bindenden Proteinen aus Genitalhautfibroblasten (GHF). 2×10^6 Cos-7 Zellen, GHF-Zellen einer Kontrollperson (wtGHF) und dem Patienten mit PAIS, vor (mGHF Extrakt vor) und nach der androgenen Stimulationstherapie (mGHF Extrakt nach) wurden für 40 h mit DHT (10^7 M), oder dem Lösungsmittel (80% Äthanol) behandelt. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte extrahiert. Je 50 μ g Protein wurden auf Eis 10 min mit 1 μ g poly(dI/dC), dann 20 min mit radioaktiv markiertem Wildtyp (wt) oder mutiertem (m) RNA-Oligonukleotid (100.000cpm, 20fmol) bei RT inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden dann auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographiert. Die Pfeile zeigen die spezifischen Protein-RNA-Komplexe an. RNA-Oligo. = RNA-Oligonukleotid.

Gesamtzellextrakte aus Cos-7 Zellen bilden, wie schon in Abbildung 22 und 23 gezeigt, spezifische Komplexe mit den mutierten RNA-Oligonukleotiden, die auch hier ein stärkeres Signal als die Genitalhautfibroblasten zeigen (Abb 24, vergleiche Spur 1 mit 2, unterer Pfeil links, mit den Spuren 5, 6, 9, 10 u. 13, 14). Mit dem wt-RNA-Oligonukleotid bildete weder Cos-7 Extrakt, noch die Extrakte aus den GHFs einen, für das mutierte RNA-Oligonukleotid spezifischen Komplex (Abb. 24, Spuren 1, 3, 4, 7, 8, 11 u. 12). Extrakte aus Genitalhautfibroblasten einer Kontrollperson und des Patienten formten auch einen charakteristischen Komplex mit dem mutierten RNA-Oligonukleotid (Abb 24, 5, 6, 9, 10, 13

u. 14 obere Pfeile). Dies weist auf ähnliche, aber nicht gleiche Proteine in den verschiedenen Zellen hin, die das mutierte RNA-Oligonukleotid erkennen und binden können. Extrakte aus Genitalhautfibroblasten des Patienten nach der einjährigen androgenen Stimulationstherapie zeigen zwar auch die Bildung eines spezifischen Komplexes mit dem mutierten RNA-Oligonukleotid (Abb. 24, Spuren 13 u. 14), aber im Vergleich zu den Komplexen im Falle der Kontrollperson und des Patienten vor der Hormonbehandlung, scheint die Bindung etwas schwächer zu sein (Abb. 24, vergleiche die Spuren 5, 6 u. 9, 10 mit 13, 14, obere Pfeile). Dies könnte an einer unterschiedlichen Proteinkonzentration liegen, die im Experiment eingesetzt wurde, oder die Extrakte aus GHFs des Patienten enthielten nach der einjährigen Androgentherapie weniger von dem Protein, das die mutierte RNA-Oligonukleotide zu binden vermag.

Dieses Experiment konnte zeigen, daß die Mutation im RNA-Oligonukleotid des menschlichen Androgenrezeptors aus dem Patienten mit Reifensteinsyndrom, sowohl von Proteinen aus Cos-7 Zellen wie auch aus Genitalhautfibroblasten erkannt und die mutierte RNA gebunden wird.

Eine lange Suche nach Zellen, in denen keine Reduktion der Menge an mutiertem Rezeptorprotein zu sehen ist, war erfolglos. Dies ließ vermuten, daß eine ubiquitär vorkommende RNase für den Abbau der mRNA verantwortlich ist. Daraufhin wurde ein *in vitro* Transkriptions/Translationssystem mit Retikulozytenlysat, bei dem durch Zugabe eines RNase-Inhibitors (RNasin) die RNasen gehemmt werden können, verwendet, um Rezeptorprotein zu translatieren. Desweiteren wurden mit diesen Extrakten RNA-Gelretardationen durchgeführt.

Eine *in vitro* Transkription/Translation mit den Expressionplasmiden des Wildtyp-AR (ARwt) und mutiertem AR (AR-G474E) wurde in An- und Abwesenheit von RNasin durchgeführt (Abb. 25 A). Dazu wurden die Expressionsplasmide mit Retikulozytenlysat aus Kaninchen, einem Aminosäuremix ohne Methionin, ³⁵S-Methionin, T7-RNA-Polymerase und RNasin, oder dem Lösungsmittel als Kontrolle 90 min bei 37 C° inkubiert. RNasin inhibiert gewöhnliche RNasen, beispielsweise RNasen A, B und C. Jeweils eine gleiche Menge Reaktionsprodukt wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gel nach dem Lauf getrocknet und autoradiographiert.

Um nochmal den Unterschied in der Menge an Rezeptorprotein in Cos-7 Zellen zu veranschaulichen wurden die Expressionsplasmide der AR zusammen mit dem Expressionsplasmid, das für den deletierten AR Δ 188 kodiert in Cos-7 Zellen transient kotransfiziert und eine *Western*-Analyse durchgeführt (Abb 25 B).

Für die RNA-Gelretardationsanalyse wurden Cos-7-Gesamtzelleextrakte, wie schon beschrieben, präpariert. Retikulozytenlysat wurde unverdünnt im Experiment eingesetzt. Die

Extrakte wurden zuerst mit poly(dI/dC) auf Eis inkubiert. Im Falle der Inkubation mit Retikulozyten- (Retik.) Extrakt wurde 1 μ l 1:2 in Wasser verdünnten RNase-Inhibitor (RNasin, 30 units/ μ l, Promega) oder 1:2 in Wasser verdünntes Lösungsmittel (80% Äthanol) als Kontrolle zugegeben. Danach wurden die radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotide zugegeben und nach 20 min eine Gelelektrophorese mit einem 4% Acrylamidgel durchgeführt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographiert.

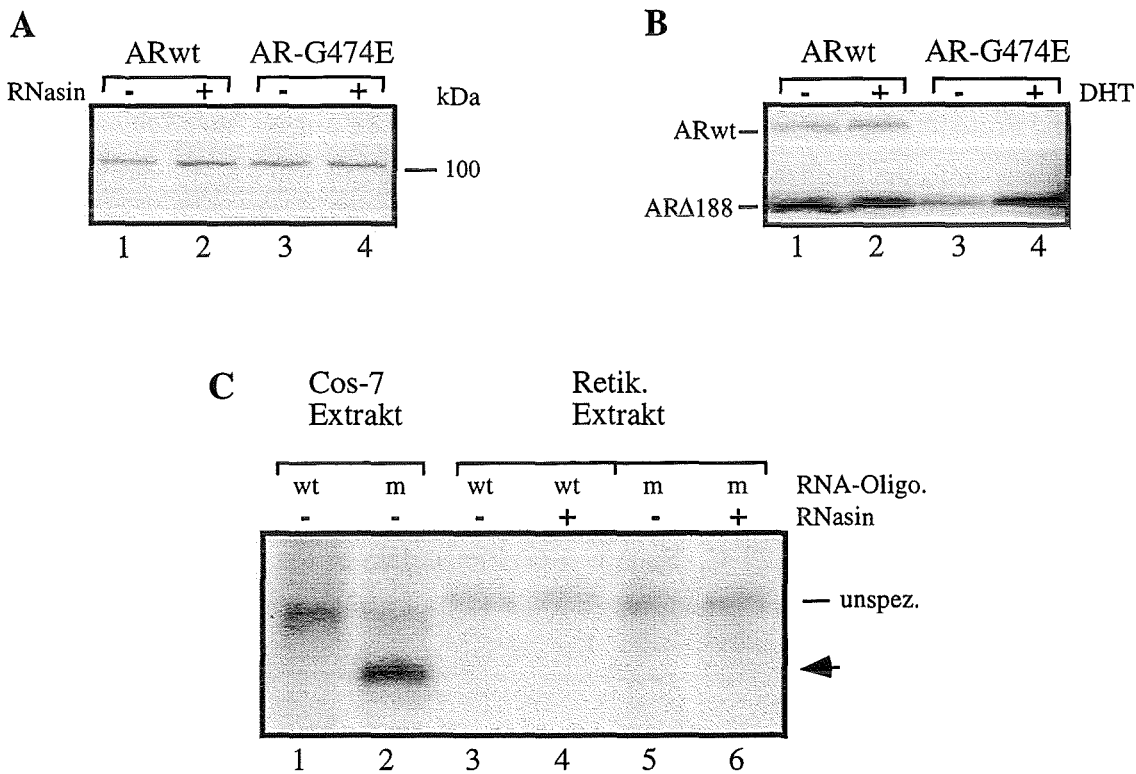


Abb 25: Proteine aus Kaninchen-Retikulozytenlysat zeigen keine Mutanten-spezifische RNA-Bindung. A) *In vitro* Transkription/Translation der Plasmide von Wildtyp-AR und der Mutante AR-G474E, die in An- und Abwesenheit von RNasin durchgeführt wurde. Je 3 μ l Reaktion wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Gel getrocknet und autoradiographiert. Die Größe eines Standardmolekulargewichtsmarkers ist angegeben. B) Immunoblot aus Cos-7 Zellen die jeweils mit Wildtyp-AR oder der Mutante AR-G474E und AR Δ 188 transient kotransfiziert und 48 h mit DHT oder dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt wurden. C) RNA-Gelretardationsexperiment zum Nachweis von RNA bindenden Proteinen aus Kaninchenretikulozyten (Retik. Extrakt) und Cos-7 Zellen. Je 50 μ g Gesamtzellextrakt aus Cos-7 Zellen oder je 4 μ l Retikulozytenlysat (Promega) wurden zuerst 10 min mit 1 μ g poly(dI/dC) auf Eis, dann 20 min mit radioaktiv markiertem Wildtyp (wt) oder mutiertem (m) RNA-Oligonukleotid (50.000cpm, 10fmol) bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Protein-Komplexe wurden auf einem 4% Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel anschließend getrocknet und autoradiographiert. Der Pfeil zeigt den spezifischen RNA-Komplex mit Cos-7 Extrakt an. unspez.= unspezifische Protein-Oligonukleotidkomplexe.

Die *in vitro* Transkription/Translation beider Rezeptorproteine war in beiden Fällen erfolgreich und zeigt keine großen Unterschiede in der Proteinmenge (Abb. 25 A, vergleiche die Spuren 1 u. 2 mit 3 u. 4). Das Signal der Proteinmenge zwischen den Ansätzen mit oder ohne RNasin ist

etwa gleichstark, es kann keine Reduktion festgestellt werden (Abb. 25 C, vergleiche die Spuren 1 mit 2 u. 3 mit 4). Verschiedene Gründe können angenommen werden: (i) das für die Bindung an das mutierte RNA-Oligonukleotid spezifische Protein, oder die für den Abbau der mutierten RNA verantwortliche RNase ist nicht in den Retikulozytenextrakten vorhanden, (ii) die RNasen in den Retikulozyten sind auch ohne RNasin gehemmt, wodurch es erst gar nicht zu einem Abbau der mutierten RNA kommt.

Der Immunoblot von Proteinextrakten aus Cos-7 Zellen, die mit den Expressionsplasmiden des Wildtyp-AR oder der Mutante AR-G474E und mit der Deletionsmutante AR Δ 188 transient kotransfiziert wurden, zeigen eine deutlich verminderte Proteinmenge im Falle der Mutante, während die Proteinmenge der kotransfizierten Kontrolle AR Δ 188 nur leichten Schwankungen unterliegt, was auf eine ähnliche Transfektionseffizienz hinweist (Abb 25 B, vergleiche die Spuren 1 u. 2 mit 3 u. 4).

Die RNA-Gelretardationsanalyse (Abb. 25 C) mit Extrakten aus Cos-7 Zellen zeigt die Bildung von Komplexen mit beiden RNA-Oligonukleotiden (Abb 25 A, Spur 1 u. 2, siehe un spez.), die nicht mutantenspezifisch sind. Sie zeigen aber auch die Bildung spezifischer Komplexe mit dem mutierten RNA-Oligonukleotid, nicht aber mit dem Wildtyp-RNA-Oligonukleotid (Abb 25 C, vergleiche Spur 1 mit 2, Pfeil). Retikulozytenextrakte bilden weder mit dem mutierten, noch mit dem Wildtyp-RNA-Oligonukleotid Mutanten-spezifische Komplexe, sie zeigen nur „unspezifische“ Bindung (Abb 25 C, Spuren 3-6, Pfeil). Inkubation von RNasin mit den Retikulozytenextrakten hatte keine Einwirkung auf die Komplexbildung (Abb 25 C, vergleiche die Spuren 3 u. 5 mit 4 u. 6).

Das Experiment zeigt, daß in Cos-7 Zellen weniger Rezeptorprotein des mutierten AR im Vergleich zum Wildtyp-AR vorhanden ist, was mit einer spezifischen Bindung von Protein an das mutierte RNA-Oligonukleotid korreliert. Mit Retikulozytenextrakten aus Kaninchen konnte keine spezifischen Bindung an das mutierten RNA-Oligonukleotid festgestellt werden, wobei die Synthese von Wildtyp und mutiertem Rezeptorprotein im *in vitro* Transkriptions/Translations-Experiment gleich ist.

Da die *in vitro* Transkription/Translation des mutierten Rezeptors auch in Abwesenheit von RNasin Protein erzeugte, im RNA-Gelretardationsexperiment aber kein spezifischer Komplex mit dem mutierten RNA-Oligonukleotid festgestellt wurde, ist zu vermuten, daß die spezifische Bindung von Protein an die mutierte mRNA eine Wirkung auf die Stabilität der mRNA hat. Ob diese(s) Protein(e) einen direkten oder indirekten Einfluß haben und welcher Art dieser Einfluß ist konnte aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt werden.

Zusammenfassend konnte dieser Teil der Arbeit zeigen, daß aminoterninale Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors zur Transaktivierung, Transrepression und DNA-Bindung

beitragen. Für die transaktivierende Funktion sind Sequenzen des N-terminalen Endes wichtig, es konnten aber keine näheren Bereiche definiert werden, welche für die Transrepression und DNA-Bindung spezifische Eigenschaften aufwiesen. Für diese Funktionen muß eine gewisse Struktur des Rezeptors aufrechterhalten werden, die von der Länge, nicht aber von spezifischen Aminosäuren des N-Terminus abhängig ist.

Eine aminoterminal Mutation, die bei einem Patienten mit partieller Androginsensitivität gefunden wurde, zeigte in transienten Transfektionsexperimenten keine transaktivierenden, reduzierte transreprimierende und schwache DNA-Bindungs-Eigenschaften. Die Protein- und mRNA-Menge der Mutante war in transienten Untersuchungen und in Genitalhautfibroblasten, im Vergleich zum Wildtyp reduziert. In RNA-Protein-Bindungsanalysen konnte ein RNA-Protein-Komplex nachgewiesen werden, bei dem spezifisch die mutierte RNA erkannt wurde. Das Protein (die Proteine) dieses Komplexes ist zelltypspezifisch und die Komplexbildung korreliert mit einer verminderten Proteinmenge des mutierten Rezeptors in diesen Zellen.

3 Diskussion

Androgene stehen in der Geschlechtsentwicklung und Differenzierung zum männlichen Phänotyp am Ende einer Kaskade von Ereignissen. Testosteron, das in Leydigzellen gebildet wird, ist hauptsächlich für die innere Virilisierung, wie die Differenzierung der Wolffschen Gänge, zuständig, wohingegen Dihydrotestosteron, welches später im Differenzierungsprozess von der 5- α -Reduktase aus Testosteron gebildet wird, für die Entwicklung der Prostata und der äußeren Geschlechtsmerkmale verantwortlich ist. Beide Sexualhormone benötigen einen funktionellen Androgenrezeptor, um ihre Wirkung zu entfalten.

Störungen der Androgenwirkung in dieser kritischen Phase der Geschlechtsentwicklung, beispielsweise durch Fehlfunktionen des Androgenrezeptors, resultieren in einer verminderten männlichen Geschlechtsdifferenzierung. Solche Fehlfunktionen können durch Mutationen im Androgenrezeptor-Gen hervorgerufen werden. Je nach Schwere solch einer Mutation treten verschieden stark ausgeprägte Krankheitsbilder auf. Man unterscheidet verschiedene Stufen der kompletten und partiellen Androgeninsensitivität (früher Testikuläre Feminisierung), welche das Reifenstein-Syndrom und Infertilitätssyndrom beinhalten.

Mutationen im AR-Gen betreffen hauptsächlich die DNA-Bindedomäne und den ligandenbindenden C-terminalen Bereich. Nur wenige N-terminale Mutationen wurden bisher gefunden. Die meisten Mutationen in diesem Bereich führen zu Stop-Codons, und somit zu trunkierten Androgenrezeptoren, welche die Androgenwirkung nicht mehr vermitteln können, und als Folge komplette Androgeninsensitivität verursachen.

Zur Übersicht siehe u. a. McPhaul et al., 1993, Eberle und Klocker, 1993, Patterson et al., 1994, Quigley et al., 1995, Brinkmann et al., 1995, MacLean et al., 1995 und Wiener et al., 1997.

3.1 Komplette Androgeninsensitivität infolge eines Defekts im Kerntransport des Androgenrezeptors

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei zwei Mutanten des Androgenrezeptors, nicht wie angenommen die Behinderung der DNA-Bindung, sondern eine Hemmung des Kerntransportes der Grund für komplette Androgeninsensitivität ist. Dies wurde in DNA-Bindungsanalysen und Immunoblots, Immunfluoreszenz- und Kernimportanalysen sowie in Protein-Protein-Interaktionsexperimenten gezeigt.

Zwei Aminosäureaustausche, R615H und R617P, die sich in der DNA-Bindungsdomäne des Androgenrezeptors befinden, wurden in Patienten mit kompletter Androgeninsensitivität gefunden, und von mehreren Autoren analysiert und beschrieben (Brown et al., 1993, Mowszowicz et al., 1993, Beitel et al., 1994, Ris-Stalpers et al., 1994, Marcelli et al., 1991 und Zoppi et al., 1992). Sie zeigten folgende Charakteristika: (i) Die spezifische Hormonbindungsaktivität der mutierten Rezeptoren lag bei beiden im Normalbereich. (ii) In transienten Transfektionsexperimenten wurde, im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor, keine Aktivität festgestellt. (iii) Die DNA-Bindungsaktivität dieser beiden Mutanten war im *in vitro* System gehemmt.

Die beiden Mutationen sind jeweils direkt nach dem zweiten Zink-Finger der DNA-Bindedomäne lokalisiert. Diese ist aber für die Dimerisierung und somit für die DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität des Rezeptors von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund kamen die Autoren zu dem Schluß, daß die Mutationen die Dimerisierung negativ beeinflussen und dadurch die DNA-Bindung des Androgenrezeptors hemmen.

In Experiment 2.1.1 dieser Arbeit wurde die DNA-Bindungsaktivität dieser beiden Mutanten untersucht, und es zeigte sich, daß nur der von Beitel berichtete DNA-Bindungsverlust der Mutante AR-R615H bestätigt werden konnte, die Mutation an Aminosäureposition 617 aber, die von Marcelli, 1991 und Zoppi, 1992 untersucht wurde, hemmt keineswegs die DNA-Bindungsaktivität des mutierten Androgenrezeptors. Warum bei Zoppi et al., 1992 keine DNA-Bindung der AR-R617P Mutante festgestellt werden konnte ist unklar.

Die Mutationen befinden sich jedoch nicht nur direkt neben der DNA-Bindedomäne des AR, sondern auch im Sequenzbereich, der für die Kerntranslokation des Rezeptors verantwortlich ist, dem sogenannten Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS).

Das NLS des Androgenrezeptors ist eine aus überwiegend basischen Aminosäuren bestehende zweigeteilte Peptidsequenz, die durch zehn nicht basische Aminosäuren getrennt wird (Jenster et al., 1991 u. 1992, Abb 26, hAR NLS). Sie liegt an Position 617-633 der Aminosäuresequenz in der Gelenk (*hinge*-)Region (AA 617-670, siehe Abb 26) des ARs, zwischen der DNA-Bindedomäne mit den zwei Zn-Fingern (538-616) und der Hormonbindedomäne (670-919, Quigley et al., 1995). Die *hinge*-Region ist unter den Steroidhormonrezeptoren, bis auf die NLS Sequenz, nicht gut konserviert (Guiochon-Mantel et al., 1989, Ylikomi et al., 1992).

Neben dem klassischen NLS gibt es noch weitere Regionen der Steroidhormonrezeptoren welche potentielle Kerntranslokationseigenschaften aufweisen, sogenannte Proto-NLS; beispielsweise wurden im Glukokortikoid-, Östrogen- und Progesteronrezeptor bis zu drei weitere Sequenzen beschrieben, die Kerntransport vermittelnde Eigenschaften aufwiesen (Picard und Yamamoto, 1987, Ylikomi et al., 1992, siehe Abb 26, p-NLS1-3 v. hPR u. hER).

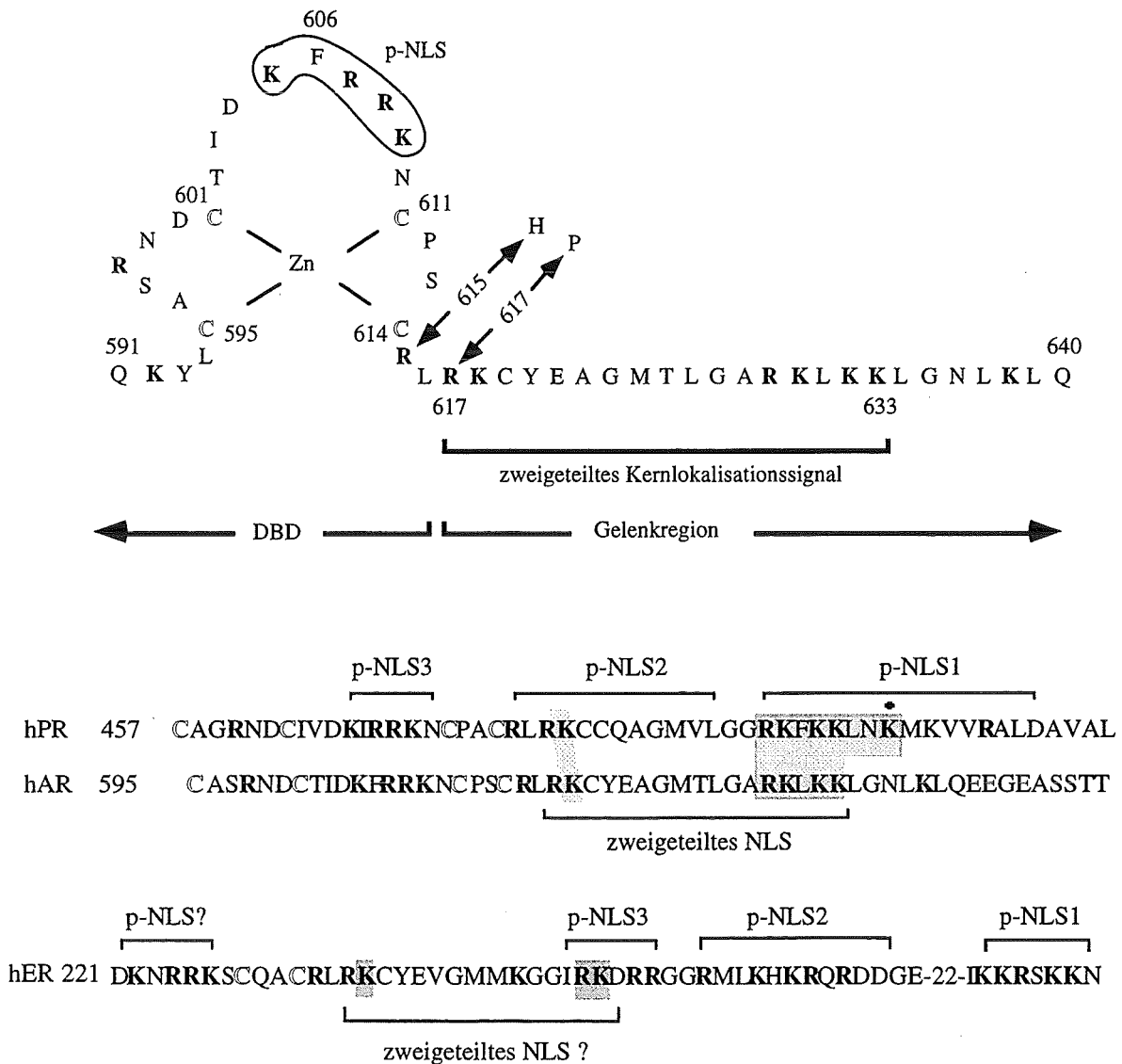


Abb 26: Schematische Illustration des zweiten Zinkfingers der DNA-Bindedomäne (DBD) des menschlichen Glukokortikoidrezeptors und Aminosäuren-Vergleich der zweiten Zn-Finger und einem Teil der vom menschlichen Androgenrezeptor (hAR) und Progesteronrezeptor (hPR) und Östrogenrezeptor (hER). Die vier Cysteine des Zn-Fingers (bzw. zwei des ER) sind in Konturschrift dargestellt. Die positiv geladenen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) wurden fett geschrieben. Grau hinterlegte positiv geladene Bereiche sind in der gesamten Steroidrezeptorfamilie konserviert. Die drei Sequenzen, die beim Progesteronrezeptor als Proto-NLS (p-NLS) beschrieben wurden, sind oben gekennzeichnet. Das klassische zweigeteilte (bipartite) Kernlokationssignal des Androgenrezeptors wurde unten eingeklammert. Die Aminosäureaustausche R615H und R617P, welche untersucht wurden sind im Zn-fingerschema markiert. Der Bereich des zweiten Zinkfingers der zu dem p-NLS3 des Progesteronrezeptors homolog ist, wurde umrandet. Zahlen bedeuten Aminosäurepositionen in den Peptidsequenzen. Der Punkt zeigt ein zusätzliches Lysin an, das in allen anderen Steroidhormonrezeptoren konserviert ist.

Eine davon befindet sich direkt im zweiten Zn-Finger der DNA-Bindedomäne der Rezeptoren (Abb 26, hPR, p-NLS3 u. hER, p-NLS?). Eine weitere, durch Hormon aktivierbare, wurde in

der Hormonbindungsdomäne des Glukokortikoidrezeptors und des Östrogenrezeptors gefunden (Ylikomi et al., 1992, siehe hER, pNLS-1). Es wurde gezeigt, daß diese Proto-NLS allein nicht ausreichen, um vollständigen Kerntransport zu bewirken. Um dies zu erreichen ist eine kooperierende Wirkung aller Sequenzen notwendig (Ylikomi et al., 1992). Der Androgenrezeptor besitzt, so wie für den Progesteronrezeptor gezeigt, eine solche angenommene Proto-NLS-Sequenz im zweiten Zn-Finger der DNA-Bindedomäne (Abb 26, Zn-Finger, p-NLS). In der Tat besitzt die Hormonbindungsdomäne in Anwesenheit des Liganden Kerntranslokationseigenschaften (Ylikomi et al., 1992, Jenster et al., 1991). Die Funktion des Zn-Finger-Bereiches in Bezug auf Kernlokalisierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Der Östrogenrezeptor besitzt mindestens drei proto-NLS die beschrieben wurden (Abb. 26, siehe hER, proto-NLS-1-3), daneben existiert eine weitere Sequenz im zweiten Zinkfinger, die wie beim AR als proto-NLS bezeichnet werden kann (Abb. 26, siehe pNLS-?). Außerdem könnten die beiden basischen Aminosäuren, die wie beim AR kurz nach dem letzten Cystein des zweiten Zinkfingers lokalisiert sind, zusammen mit dem p-NLS3 als zweigeteiltes NLS wirken (Abb. 26, siehe zweigeteiltes NLS ?). Dieses wäre nicht durch zehn, sondern durch elf Aminosäuren getrennt (Abb. 26, vergleiche die zweigeteilten NLS von AR und ER).

Außer den beiden hier behandelten Mutationen wurde bisher nur ein Aminosäureaustausch in der *hinge*-Region des AR beschrieben. Diese, an Position 664 liegende Mutation, hemmt die Hormonbindungsaktivität und führt zu partieller AIS (Pinsky et al., 1992, Quigley et al., 1995). Natürliche Mutationen in dieser Region in anderen Steroidhormonrezeptoren, welche zu Krankheiten führen, sind bisher nur wenige bekannt. Eine Punktmutation im menschlichen Vitamin-D-Rezeptoren beispielsweise, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an der gleichen Position wie bei der AR-R615H Mutante führt, wird von Sone et al., 1990 beschrieben. Diese Mutation wurde in Patienten mit vererbbarer 1,25-Dihydroxyvitamin-D3-Resistenz gefunden. Eine Untersuchung ihrer Kernlokalisationsfähigkeit wurde jedoch nicht durchgeführt. In Hormonbindungsstudien zeigte sie, im Vergleich zum Wildtyp, die gleiche Affinität für die Bindung von radioaktiv markiertem Hormon aber eine geringere Affinität in Kernfraktionen (Sone et al., 1990), was darauf hinweist, daß weniger Rezeptor im Kern vorhanden war.

Künstliche Mutationen oder Deletionen des NLS führen dazu, daß der Androgenrezeptor nicht mehr in den Kern transportiert wird (Simental et al., 1991, Zhou et al., 1994). Aus diesen Gründen war es naheliegend, die Fähigkeit des Kerntransports der mutierten Rezeptoren zu überprüfen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der Androgenrezeptor ohne Hormonbindung ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Induktion mit Androgen, war das Rezeptorprotein

ausschließlich im Kern vorhanden. Im Falle der beiden Mutanten AR-R615H und AR-R617P konnte auch nach Hormoninduktion keine, oder nur eine sehr schwache, Kerntranslokation beobachtet werden. Das Fluoreszenzsignal der mutierten Rezeptoren war hauptsächlich außerhalb des Kerns, an der Kernmembran, lokalisiert. Zwar verfügt der Androgenrezeptor über mehrere Proto-Kernlokalisations-signale, das klassische zweigeteilte (*bipartite*) NLS scheint jedoch dominant zu sein, da eine einzelne Mutation in dieser Sequenz den Transport der Mutante AR-R617P verhindert. Für die Mutante AR-R615H stellt sich die Situation etwas anders dar. Die Mutation liegt nicht direkt in der angenommenen *bipartite* Sequenz des Androgenrezeptors, sondern etwas außerhalb. Hieraus ergibt sich die Frage ob die zweigeteilte Sequenz des Androgenrezeptors um zusätzliche Aminosäuren erweitert werden muß, oder die Kernlokalisations-signale der Steroidhormonrezeptoren allgemein neu definiert werden müssen. Vergleicht man die zweigeteilten NLS der klassischen Steroidhormonrezeptoren (Androgen- (AR), Glukokortikoid- (GR), Östrogen- (ER), Progesteron- (PR) und Mineralokortikoidrezeptor (MR), so gibt es einige Unterschiede. Der ER besitzt beispielsweise keine zehn nicht-basische Aminosäuren, welche das zweigeteilte NLS trennen, er hat zusätzlich ein Lysin mehr in diesem Bereich (siehe Abb. 26 u. 27), außerdem besitzt er mindestens vier potentielle p-NLS; der PR besitzt, wie alle Steroidhormonrezeptoren, außer dem AR, ein zusätzliches Lysin in der *bipartite* Sequenz (Ylikomi et al., 1992). Diese Unterschiede könnten bei der Erkennung durch Kerntransportproteine eine wichtige Rollen spielen.

Ein anderer experimenteller Ansatz war die *in vitro* Kernimportanalyse. Mittels dieser Analyse konnte gezeigt werden, daß das NLS des Androgenrezeptors, fusioniert an ein bakterielles Protein, ausreicht um Kerntransport zu ermöglichen. Auch in diesem *in vitro* Experiment verhinderten die beiden Mutationen R615H und R617P den nukleären Transport der NLS-Fusionsproteine.

Da der Transport des Androgenrezeptors in den Kern eine Voraussetzung für eine genomische Wirkung der Androgene ist, erklärt dies die von den Autoren (Beitel und Zoppi) berichtete Unfähigkeit der Mutanten, ARE-enthaltene Promotoren von Reportergenen, in transienten Transfektionen zu aktivieren (Beitel et al., 1994, Marcelli et al., 1991).

Der Kerntransport von Proteinen die ein Kernlokalisations-signal (NLS) besitzen, wird durch eine Anzahl verschiedener Proteine, in einen mehrere Schritte umfassenden Prozess, ermöglicht. Diese Proteine werden von NLS-Rezeptoren gebunden, an die Kernmembran transportiert und in einem weiteren Schritt unter Energieverbrauch durch die Kernpore in den Zellkern transportiert (zur Übersicht siehe Newmeyer und Forbes, 1988, Richardson et al., 1988, Silver, 1991, Moore und Blobel, 1992, Powers und Forbes, 1994, Rexach und Blobel, 1995, Simos und Hurt, 1995, Görlich und Mattaj, 1996, Pennisi, 1998).

Es stellt sich die Frage welcher Schritt des Kerntransports durch die Mutationen gehemmt wird. Um diese Frage zu beantworten wurde die Interaktion des AR mit den NLS-Rezeptoren Importin- α Importin- β untersucht.

Es ist bekannt, daß Importin- α an das NLS von Kernproteinen bindet und sich danach Importin- β anlagert, welches für die Interaktion mit den Kernporenproteinen zuständig ist (Görlich und Mattaj, 1996). Die Interaktion zwischen Importin- α mit Importin- β erfolgt über die sogenannte Importin-beta bindende Domäne (*importin-beta binding domain*, *IBB domain*, Görlich et al., 1996a) von Importin- α . Dieser Sequenzbereich ist im N-terminus von Importin- α lokalisiert und besteht aus etwa 40 Aminosäuren, welche einen überwiegend basischen Charakter besitzen (Weis et al., 1996a, Görlich et al., 1996a, Abb. 27, siehe IBB- α). Die Sequenz hat große Ähnlichkeit mit einem typischen NLS, und ist in der Lage, Kernimport in Abwesenheit von Importin- α zu ermöglichen.

Die Bindung von Importin- α an ein NLS konnte in den Protein-Interaktionsexperimenten durch Verwendung des chimären Kontrollproteins β -Gal-SV40NLS (siehe auch Abb. 27) deutlich gezeigt werden, welches nur von Importin- α , nicht aber von Importin- β gebunden wurde. Aber sowohl das AR-NLS-Fusionsprotein, das zusätzlich die Proto-NLS-Sequenzen besitzt, als auch der komplette Androgenrezeptor wurden sowohl von Importin- α als auch von Importin- β gebunden. Die Interaktion mit Importin- β war sogar etwas stärker als mit Importin- α . Entweder bindet Importin- β unspezifisch an andere Sequenzen des Fusionsproteins bzw. des Androgenrezeptors, oder Importin- β erkennt das NLS zusammen mit dem Proteo-NLS als „IBB“-Domäne. Obwohl die beiden Mutanten AR-R615H und AR-R617P in Immunfluoreszenzexperimenten nicht im Kern lokalisiert waren, interagierten sie, beziehungsweise die beiden mutierten AR-NLS-Fusionsproteine, mit beiden Importproteinen und mit gleicher Intensität. Es konnte keine Hemmung der Interaktion durch die Mutationen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse können unterschiedlich erklärt werden:

(i) Die rekombinanten und gereinigten Transportfaktoren Importin- α und Importin- β könnten eine vom klassischen NLS unterschiedliche Sequenz im Androgenrezeptor, beziehungsweise in den β -Gal-NLS-Fusionsproteinen, erkennen.

(ii) Die untersuchten Kerntransportproteine Importin- α und Importin- β sind nicht in Cos-7 Zellen vorhanden, in denen durch Immunfluoreszenz keine Kernlokalisierung der Mutanten AR-R615h und AR-R617P festgestellt wurde, oder es sind nicht die Proteine die für den Kerntransport des Androgenrezeptors (oder von Steroidhormonrezeptoren allgemein) zuständig sind.

(iii) Der Androgenrezeptor, und dessen hier untersuchte Mutanten, werden von den Kerntransportproteinen Importin- α und Importin- β mit einer ähnlich guten Affinität gebunden.

zu (i): Die Aminosäuresequenz, welche für die β -Gal-NLS-Fusionsproteine verwendet wurde erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 578-667, welche den zweiten Zinkfinger mit dem p-NLS der DNA-Bindungsdomäne und das klassische NLS beinhaltet. Für die Bindung von Importin- α scheinen die Mutationen keine Rolle zu spielen, da es auch ein einfaches NLS, wie das SV40-NLS (Abb.27) erkennt, was durch die Bindung der Kontrolle β -Gal-SV40NLS gezeigt wurde. Die Mutationen liegen nicht in diesem Bereich. Außerdem könnte Importin- α auch an das Proto-NLS (Abb. 27, p-NLS) im Androgenrezeptor binden.

Nimmt man den Bereich des zweiten Zn-Fingers des AR zusammen mit dem klassischen NLS, so kommt man auf eine etwa 40 Aminosäuren lange Sequenz mit überwiegend basischem Charakter, die große Ähnlichkeit mit der IBB-Domäne von Importin- α besitzt (Abb. 27, vergleiche hAR mit IBB- α). Man könnte daher vermuten, daß Importin- β diese als Bindungssequenz erkennen kann, auch wenn in den Mutanten jeweils eine basische Aminosäure ausgetauscht ist.

Um eine Bindung der NLS-Rezeptoren Importin- α und Importin- β an Bereiche außerhalb des klassischen NLS, in zukünftigen Bindungsstudien zu vermeiden, sollte nur die Sequenz, die das NLS und die Mutationen einschließt, verwendet werden. Es wäre natürlich auch interessant, ob das Proto-NLS im zweiten Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne am Kerntransport beteiligt ist.

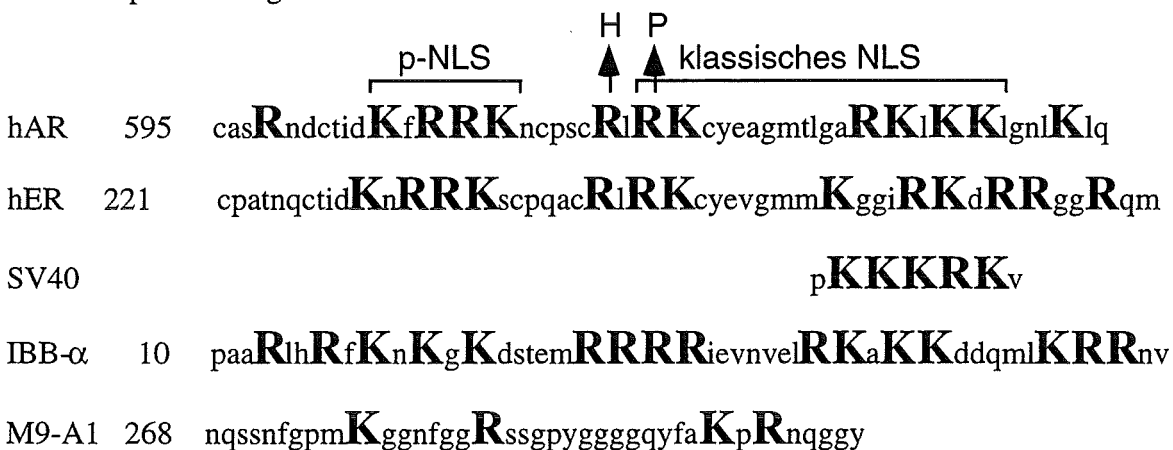


Abb 27: P-NLS plus bipartite NLS des AR zeigt Ähnlichkeit mit der Importin- β -Bindungsdomäne (IBB) von Importin- α . Aminosäuresequenzvergleich des zweiten Zinkfingers, dem NLS des menschlichen Androgenrezeptors (hAR) und dem NLS des menschlichen Östrogenrezeptors, mit der Importin- β -Bindungsdomäne (IBB- α) von Importin- α (Weis et al., 1996a) und dem als M9 bezeichneten Kernlokalisierungssignal des Ribonukleoproteins A1 Pollard et al., 1996). Die M9 Sequenz wird von einem neuen Kerntransportfaktor (Transportin) erkannt. Die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) sind groß und fettgedruckt hervorgehoben. p-NLS = potentielles proto-NLS. bipartite = zweigeteilt. Die Aminosäureaustausche der Mutanten AR-R615H und AR-R617P sind durch Pfeile markiert

zu (ii): Kürzliche Entdeckungen haben gezeigt, daß Importin- β , oder Importin- β verwandte Proteine, allein für den Kerntransport von Proteinen zuständig sein können. Pollard et al. haben ein neues NLS (M9) definiert (Abb. 27, M9), das von einem neuen spezifischen, Importin- β verwandten Protein (Transportin) erkannt wird, und allein Kernimport ermöglicht (Pollard et al., 1996). Die M9-Sequenz zeigt aber im Vergleich zum Androgenrezeptor keine Homologie (Abb. 27, vergleiche hAR mit M9).

Palacios et al. haben den Kernimport von U-snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) untersucht; sie fanden heraus, daß Importin- β dafür allein zuständig ist, und daß die Anwesenheit der IBB-Domäne den Import blockiert (Palacios et al., 1997). Weitere Importin- β verwandte Importproteine und neue Kernlokalisations-signale (Truant et al., 1998) sind auch in anderen Organismen, beispielsweise in der Hefe (karyopherin β 1-4) oder im Krallenfrosch *Xenopus laevis*, gefunden worden, und es konnte gezeigt werden, daß diese Transportfaktoren allein, oder zusammen mit dem Homolog zu Importin- α , Kernimport vermitteln (Görlich et al., 1994, Rosenblum et al., 1997, Rout et al., 1997).

Dies läßt vermuten, daß noch viele unentdeckte Transportfaktoren und Kerntransportwege existieren. „The prediction is that there are as many (transport) pathways as there are factors. (Die Voraussage ist die, daß es so viele (Transport-) Wege wie Faktoren gibt)“ Dirk Görlich, ZMBH, Heidelberg, in Pennisi, 1998).

Für eine weitere Untersuchung des Mechanismus des Kerntransports und der Mutationen im NLS des AR, würden Experimente, wie *Import Assays* oder Protein-Interaktionsexperimente, mit diesen neuentdeckten Faktoren beitragen.

zu (iii): Durch die Mutationen könnten, im Vergleich zum Wildtyp-AR, verschieden strukturierte Komplexe entstehen, welche in einem späteren Schritt des Kerntransports, an der Kernpore, erkannt werden, und erst hier zur Hemmung des Kernimports führen. Der Transport durch die Kernpore ist ein multipler, energieverbrauchender Prozess, bei dem zusätzliche Proteine (beispielsweise Ran-GDP, p10 und Kernporenproteine) beteiligt sind (Weis et al., 1996b, Görlich und Mattaj, 1996). Der Mechanismus ist zwar schon sehr gut untersucht, aber dennoch nicht ganz geklärt. In den Kernimport-Analysen war das Signal der mutierten NLS-Chimären, auch in Anwesenheit von Energie, nur an der Kernmembran und nicht, wie beim Wildtyp-Fusionsprotein, im Kern lokalisiert. Da die Bindung der Kerntransportproteine nicht energieabhängig ist, sondern der Transport durch die Kernpore selbst, ist zu vermuten, daß dieser Schritt des Kerntransportes durch die Mutationen im Androgenrezeptor gehemmt wird.

Für die Überprüfung dieser Annahme würden sich Protein-Protein-Interaktionsanalysen (*pull down assay* oder Ko-Immunopräzipitationen) eignen, womit die Interaktion des Wildtyp-AR und der AR-Mutanten im Komplex mit den NLS-Rezeptoren und den weiteren beteiligten Proteinen, untersucht werden kann.

Solche Experimente, in Verbindung mit Kernimportanalysen, können zu einer weiteren Aufklärung des Importmechanismus beim Androgenrezeptor, beziehungsweise allgemein der Steroidhormonrezeptoren, verhelfen. Weiterhin könnten die NLS-Mutanten des AR für die Aufklärung dieses Mechanismus als nützliche Werkzeuge dienen.

Aus den hier vorgelegten Ergebnisse kann geschlossen werden, daß die Aminosäureaustausche R615H und R617P im menschlichen Androgenrezeptor dazu führen, daß der Kernimport dieser mutierten AR gehemmt wird. Da dies eine Voraussetzung für DNA-Bindung und Genregulation ist, wäre es vorstellbar, daß solche Mutationen komplette Androgeninsensitivität verursachen.

Darüberhinaus kann man postulieren, daß es für den Androgenrezeptor einen weiteren, oder zumindest einen vom klassischen Modell abweichenden, Mechanismus des Kernimports gibt.

3.2 Funktion aminoterminaler Sequenzen des menschlichen Androgenrezeptors bei der Transaktivierung, Transrepression und DNA-Bindung

Der N-Terminus des Androgenrezeptors ist zu den anderen Steroidhormonrezeptoren die am wenigsten konservierte funktionelle Region. Er wird durch ein einziges Exon kodiert und nimmt den größten Teil des Androgenrezeptors ein. Trotzdem ist er am wenigsten in seinen Eigenschaften charakterisiert, es ist bekannt, daß er transaktivierende Eigenschaften besitzt, welche bestimmten Bereichen zugeordnet werden können (Jenster et al., 1992, Beato et al., 1995, Chamberlain et al., 1996). Außer der transaktivierenden Aktivität wird dem N-Terminus des AR auch eine Funktion in der DNA-Bindung und der Dimerstabilisierung zugewiesen, welche durch Interaktion mit anderen Proteinen oder mit dem eigenen C-Terminus vermittelt werden (Kupfer et al., 1993, Zhou et al., 1995).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden N-terminale Bereiche vom Androgenrezeptor genauer untersucht, um erstens die transaktivierende Funktion von der transreprimierenden Funktion zu trennen und zweitens um den Beitrag des N-Terminus zur DNA-Bindung genauer zu lokalisieren. Dazu wurden N-terminale Deletionsmutanten und chimäre Mutanten des Androgenrezeptors in Transaktivierungs-, Transrepressions- und DNA-Protein-Interaktionsanalysen untersucht.

Die Untersuchung des N-Terminus ergab, daß für die Transaktivierung bestimmte Bereiche des Androgenrezeptors notwendig sind. Chamberlain et al. definierten zwei Transaktivierungsdomänen AF-1a (Aminosäuren (AS) 154-167) und AF-1b (AS 295-359, Chamberlain et al., 1996), die mit Ergebnissen, die hier vorgestellt wurden, übereinstimmen. Eine Deletion des N-Terminus bis AS 188 hatte eine Reduktion der Transaktivierung von etwa 30-40% zur Folge, weitere Deletionen bis AS 340 bzw. 440 eine weitere Reduktion um ca. 50%. Interne Deletionen von Bereichen, die sich näher an der DNA-Bindungsdomäne befinden, verstärkten eher die Transaktivierung als daß sie sie hemmten. Dies zeigt, daß Aminosäuren bestimmter Regionen des N-Terminus zur Transaktivierung beitragen. Dieser Befund ist auch in Übereinstimmung mit Berichten aus der Literatur, die beschreiben, daß die transaktivierende Aktivität des Androgenrezeptors in den ersten 338 Aminosäuren zu finden ist (Simental et al., 1991, Jenster et al., 1991 u. 1992) und korreliert weiterhin mit einer Veröffentlichung, in der gezeigt werden konnte, daß Aminosäuren zwischen Position 142 und 485 an die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIB und das TATA-bindende Protein (TBP) binden und dadurch ein Reporter gen aktivieren können (McEwan und Gustafsson, 1997).

Interessanterweise wurde in einem anderen Bericht den Aminosäuren 147-296 beide, aktivierende und reprimierende Eigenschaften zugewiesen (Kallio et al., 1995).

Werden N-terminale Sequenzen durch interne Deletionen näher an die DNA-Bindungsdomäne gebracht, hat das eine Verstärkung der Transaktivierungsaktivität zur Folge, die mit einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität korreliert. Durch Austausch N-terminaler Regionen mit einer nicht-homologen Sequenz, welche keine transaktivierende Eigenschaft besitzt (Nebl und Cato, 1995), konnte zwar die verlorene DNA-Bindung zweier Deletionsmutanten wiederhergestellt werden, der Verlust der Transaktivierung konnte jedoch nicht rückgängig gemacht werden. Für den Beitrag des N-Terminus zur Transaktivierungsaktivität werden daher, im Gegensatz zur DNA-Bindungsaktivität, spezifischere Sequenzen benötigt.

N-terminale Bereiche, die zur DNA-Bindung und Transrepression beitragen sind unspezifischer Natur, da keine spezifischen N-terminalen Sequenzen oder Regionen gefunden wurden, deren Funktion nicht durch andere Bereiche des N-Terminus oder durch Fremdsequenzen ersetzt werden konnten.

Palvimo et al. berichteten, daß die Deletion der Aminosäuren 147-408 zu einer geringen Reduktion der DNA-Bindung führt (Palvimo et al., 1993). Die Autoren kamen nach weiteren Experimenten zum Schluß, daß interne N-terminale Deletionen die Dimerisierung während der Interaktion des Rezeptors mit der DNA stören. Eriksson und Wrangé untersuchten den Beitrag des N-Terminus des Glukokortikoidrezeptors (GR) zur DNA-Bindung, indem sie den ganzen N-Terminus des GR deletierten (Eriksson und Wrangé, 1990). Ihre Ergebnisse lassen vermuten, daß durch die Deletion die sterische Struktur der DNA-Bindungsdomäne verändert wird, wodurch die DNA-Bindungsspezifität des GR für das Glukokortikoid responsive Element herabgesetzt wird. Die tertiäre Struktur des Androgenrezeptors scheint ebenfalls von Bedeutung für die DNA-Bindung zu sein, da Deletionsmutanten, die nicht mehr oder nur schwach an DNA binden konnten (AR Δ 488, AR Δ 510), nach Fusion mit der Sequenz des Kernfaktors NF1X3, wieder in der Lage waren, DNA zu binden. Es ist daher wahrscheinlich, daß N-terminale Regionen des AR indirekt zu einer Stabilisierung der DNA-Bindung beitragen. Dies kann durch Interaktion des N-Terminus mit internen C-terminalen Regionen erreicht werden, wie es von Zhou et al. postuliert wird (Zhou et al., 1995). Die Stabilisierung könnte auch durch Interaktion mit anderen Proteinen erreicht werden. Beispielsweise berichteten Kupfer et al., daß das Insulin degradierende Enzym (IDE) durch Interaktion mit dem N-Terminus des AR verstärkend auf die DNA-Bindung wirkt (Kupfer et al., 1994).

All diese Befunde zusammengenommen lassen vermuten, daß eine Stabilisierung des Rezeptordimers, beziehungsweise dessen Struktur, durch Interaktion der N-Termini mit den C-Termini oder Interaktion N-terminaler Bereiche mit anderen Proteinen zur DNA-Bindungsaktivität des Androgenrezeptors beitragen.

Von reprimierenden Eigenschaften des Androgenrezeptors wurde schon 1978 berichtet, als Bulfield und Nahum fanden, daß in der Androgenrezeptor negativen *Maus (testicular feminization (Tfm) Maus)*, die Hemmung eines Androgen-reprimierten Enzyms aufgehoben war (Bulfield und Nahum, 1978). Untersuchungen über die Funktion des Androgenrezeptors offenbarten verschiedene Mechanismen AR-vermittelter Repression. Zum einen konnte gezeigt werden, daß durch DNA-Bindung des Rezeptors an ein negatives Androgen-responsives Element eine reprimierende Wirkung vermittelt werden kann (Zhang et al., 1997), zum anderen spielen Proteininteraktionen, abhängig und unabhängig von der Bindung des AR an die DNA, eine große Rolle in der AR-vermittelten Repression der Transkription (Aarnisalo et al., 1998, Heckert et al., 1997, Burgos-Trinidad et al., 1997).

Es existieren unterschiedliche Berichte darüber, welche Bereiche des AR zur Reprimierung beitragen. Dies hängt damit zusammen, daß die Repression der Transaktivierung bei verschiedenen Zielgenen und die Interaktion des Androgenrezeptors mit unterschiedlichen Proteinen untersucht wurde. Palvimo et al. zeigten, daß N-Terminale Bereiche zwischen Aminosäure 298 und der DNA-Bindungsdomäne (DBD) für die Hemmung eines NF κ B induzierten Reportergens von Bedeutung sind (Palvimo et al., 1996). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die DBD und die Hormonbindungsdomäne (HBD), ohne Beteiligung des N-Terminus, reprimierende Aktivität auf das „*prostate specific antigen*“-Gen (Sato et al., 1997), bzw. auf das Gen, das für die Alpha Untereinheit des Lutenisierenden Hormones und des Folikelstimulierenden Hormons kodiert (Heckert et al., 1997).

In der vorgelegten Arbeit wurde die Repression an einem durch einen Phorbolster induzierbaren Reporterkonstrukt untersucht, für das gezeigt wurde, daß die Repression durch den Androgenrezeptor über Proteininteraktion mit dem Onkoprotein ERM (*Ets related molecule*) stattfindet (Schneikert et al., 1996, Gast et al., im Druck). Alle verwendeten Deletionsmutanten, außer AR- Δ 536, besaßen eine ähnlich stark hemmende Wirkung auf die Induktion des Reporterkonstrukts. Für AR- Δ 536 konnte gezeigt werden, daß er trotz der Deletion noch mit ERM interagiert (Schneikert et al., 1996) und daß durch die Verlängerung des N-Terminus dieser Deletionsmutante mit einer fremden Sequenz, die reprimierende Eigenschaft wiedererlangt wird (Gast et al., im Druck). Diese Befunde zeigen, daß für die reprimierende Aktivität des Androgenrezeptors Proteininteraktionen (in diesem Fall durch Sequenzen der DBD und HBD) notwendig sind.

Die Hemmung der Transaktivierung könnte durch spezifische Bindung des Androgenrezeptors an transaktivierende Proteine bewirkt werden, welche durch eine unspezifische Interaktion mit N-terminalen Bereichen in ihrer transaktivierenden Aktivität gehemmt werden (McEwan und Gustafsson, 1997). Eine andere Möglichkeit wäre auch, daß durch die spezifische Bindung des AR an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren, die Transkriptionsmaschinerie durch Interaktion mit dem N-Terminus davon abgehalten wird, weitere Gensequenzen abzulesen.

Bessere Erkenntnisse über die Funktionen des N-Terminus vom Androgenrezeptor könnten gezieltere Deletionsmutanten, Punktmutationen und Fusionsproteine aus N-terminalen Bereichen und DNA-Bindungsdomänen fremder Proteine liefern, die in Transaktivierungs-, Transrepressions- und DNA-Bindungsstudien untersucht werden sollten. Für die Identifizierung von Proteinen, die mit N-terminalen Bereichen des AR interagieren, würden sich Chimären aus N-terminalen Regionen des AR und Hefe-Proteinen eignen, mit denen Proteininteraktionen in der Hefe getestet werden können. Dies könnte aber Probleme aufwerfen, da der N-Terminus auch transaktivierende Eigenschaften besitzt. Bessere Methoden wären Proteininteraktionsstudien mit anschließenden Proteinsequenzierungen.

Eine N-terminale Mutation im Androgenrezeptor, die bei einem Patienten partielle Androgeninsensitivität verursachte und nicht zu einem Translationsstop führte, wurde zuerst in transienten Transaktivierungs-, Transrepressions- und DNA-Bindungsanalysen untersucht. Diese ergaben, daß der mutierte Rezeptor in der Vermittlung all dieser Funktionen gehemmt ist. Die Ursache hierfür ist eine verminderte Proteinsynthese der Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor. RNA-Analysen transient transfizierter Cos-7 Zellen ergaben eine um etwa 50% geringere mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp. Eine ähnlich starke Reduktion konnte durch RT-PCR in Genitalhautfibroblasten (GHF) des Patienten, im Vergleich mit Kontrollpersonen, festgestellt werden. Verminderte RNA-Mengen, in Verbindung mit Mutationen im AR-Gen, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet. Choong et al. beschrieben einen Aminosäureaustausch im C-Terminus des AR (Aminosäureaustausch an Position 907 von Glyzin zu Arginin), welcher mit einer reduzierten Ligandenbindungsaffinität und mRNA-Menge zusammenhing (Choong et al., 1996a). In einer anderen Veröffentlichung beobachteten Choong et al. eine Relation zwischen der Länge der homopolymeren N-terminalen Glutaminregion (43 und 65 Glutamine) und verminderter mRNA-Mengen (Choong et al., 1996b). Da die beschriebenen Mutationen und die hier untersuchte Mutation in verschiedenen Bereichen liegen, erscheint es, daß bestimmte kodierende Regionen des Androgenrezeptors für die Stabilität der mRNA des Rezeptors kritisch sind.

Proteinuntersuchungen von Genitalhautfibroblasten des Patienten ergaben, daß im Vergleich zum Wildtyp wesentlich weniger Protein vorhanden war. Die Proteinmenge konnte aber auch durch Inkubation mit dem Androgen Dihydrotestosteron, wie bei der Kontrolle stabilisiert werden. Dies wurde besonders bei niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen deutlich. Dieser Befund ist auch mit der spezifischen Androgenbindung in GHFs des Patienten vergleichbar, die vor einer androgenen Stimulationstherapie deutlich verringert war, während die Affinität jedoch im Normalbereich lag ($B_{max}=1,9$ fMol/1 Mill. Zellen, Normal >5 fMol/Mill Zellen).

Die RNA- und Proteinmenge in GHFs nach einer einjährigen Androgentherapie war überraschenderweise wieder im Normalbereich (korreliert auch mit der normalisierten Spezifischen Androgenbindung, $B_{max}=6.3$ fMol/Mill Zellen). Für diesen Befund gibt es bisher jedoch noch keine Erklärung. Die Hormonbehandlung muß in den Zellen zu einschneidenden Veränderungen geführt haben, wodurch der Effekt der Mutation überwunden werden konnte. RNA-Protein-Bindungsanalysen mit Extrakten sowohl aus Cos-7 Zellen wie auch Genitalhautfibroblasten zeigten die Bildung spezifischer Protein-RNA-Komplexe mit mutierten mRNA-Oligonukleotiden, während mit Lysaten aus Retikulozyten von Kaninchen keine spezifischen Komplexe auftraten.

Die Stabilität von mRNAs wird durch viele Elemente bestimmt: (i) die 5'-liegende 7-Methylguanosin-Kappe der mRNA, welche bei Entfernung, das 5'-Ende für 5'-3-Exonukleasen freigibt; (ii) Sekundärstrukturen im offenen Leseraster, die in 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR) auftreten können und dadurch die Translation behindern, was einen Abbau durch Ribosomen-gekoppelte degradierende Enzyme (beispielsweise Ribonukleasen) initiieren kann; (iii) vorzeitige Terminations-Kodons, deren Wirkung auch mit dem Translationsapparat zusammenhängt, wobei der Mechanismus noch unklar ist; (iv) destabilisierende Sequenzen im offenen Leserahmen, wobei vermutet wird, daß der Abbau mit Ribosomen gekoppelt ist; (v) Sequenzen im 3'- Bereich, wie z.B. das Adenin-Uracil (AU)-reiche Element, die von Proteinen gebunden werden und eine Deadenylierung des poly-A-Schwanzes bewirken, was zum schnelleren Abbau der mRNA führt und (vi) den poly-A-Schwanz, durch dessen Deadenylierung verschiedene Exo- und Endonukleasen die mRNA angreifen können (Sachs, 1993, Decker und Parker, 1994). Allgemein wird von Sachs vermutet, daß all diese Elemente unter anderem zu einer Deadenylierung des poly-A-Schwanzes führen, wodurch die RNA destabilisiert wird (Sachs, 1993).

Die Mutation in der mRNA, die bei dem Patienten mit Reifensteinsyndrom gefunden wurde, liegt im offenen Leserahmen der mRNA. In diesem Bereich kommen keine destabilisierenden AU-reichen Elemente oder purinreiche Elemente vor, wie sie in der c-fos kodierenden Region gefunden wurden und dort zu einer Destabilisierung der c-fos mRNA beitragen (Chen et al., 1992). Destabilisierende Elemente im offenen Leserahmen können auch sogenannte seltene Kodons sein (ein von mehreren Kodons für eine Aminosäure, das seltener als die anderen verwendet wird), welche den Translationsapparat bei der Elongation aufhalten (*pausing*), wobei vermutet wird, daß Ribosomen-assoziierte degradierende Enzyme zu einem Abbau der mRNA führen (Sachs, 1993). Durch die Mutation (GGA zu GAA) wird kein seltenes Kodon, wie sie von Knippers et al., 1995 vorgeschlagen werden, erzeugt (Knippers et al, 1995).



Abb. 28: Vorgeschlagene Sekundärstruktur der Wildtyp und mutierten AR-mRNA. A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, U=Uracil. wt=Nukleinsäure in der Wildtyp AR-mRNA-Sequenz. Die Klammer umrahmt das Kodon für Glutaminsäure, die in der mutierten mRNA statt Glyzin vorkommt. Der Pfeil deutet auf den Nukleotidaustausch, der durch die Mutation hervorgerufen wird.

Würde man eine Sekundärschleife aus dem Bereich der mRNA mit der Mutation entwickeln, so würden durch die Mutation einige Veränderungen auftreten (siehe Abb. 28, Guanin (G) zu Adenin (A) Austausch).

Es kann vermutet werden, daß solche Veränderungen in der Sekundärstruktur zu einer Hemmung der Elongation des Proteinsyntheseapparates führen und dadurch Ribosomen-assoziierte, degradierende Enzyme den Abbau der mRNA bewirken. Es wäre auch möglich, daß Proteine diese Struktur spezifisch erkennen und dann entweder die Proteinsynthese aufhalten, wodurch es dann auch zu einer Degradation der mRNA kommen kann. Solche Proteine könnten auch andere Effekte bewirken, wie z.B. eine weitere Strukturänderung in der mRNA oder die Initiation der Deadenylierung des poly-A-Schwanzes, welche einen Abbau der mutierten mRNA einleiten könnte.

Ob das Protein (die Proteine), das (die) in RNA-Gelretardationsanalysen spezifisch an die mutierte mRNA aus dem Patienten mit Reifensteinsyndrom gebunden haben, solcher Art sind ist ungewiß und konnten in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen leider nicht identifiziert werden.

Extrakte aus Genitalhautfibroblasten des Patienten mit der mutierten mRNA nach der einjährigen androgenen Stimulationstherapie zeigten eine Reduktion in der Bindung an das mutierte mRNA-Oligonukleotid. Es wäre deshalb auch möglich, daß die Hormonbehandlung zu

nicht erklärbaren Veränderungen in den Zellen führte, welche eine Repression der Synthese dieses Proteins als Folge hatte.

Experimente für die Identifikation und Funktion dieser Proteine würden die Reinigung der Proteine und die Bestimmung der Proteinsequenz beinhalten, welche eine Aussage über die Art der Proteine liefern könnte. Danach könnten dann die Degradation der mutierten RNA im Vergleich zur Wildtyp-AR-mRNA in Anwesenheit der Proteine untersucht werden.

Durch die Untersuchung der N-Terminalen Mutation, die bei einem Patienten mit partieller Androgeninsensitivität gefunden wurde, konnte gezeigt werden, daß die Mutation eine Verringerung in der Menge an Androgenrezeptor-Boten-RNA bewirkt, was zu einer verminderten Rezeptorkonzentration führt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die mutierte mRNA von zellspezifischen Proteinen gebunden wird. Es ist daher zu vermuten, daß die Mutation in der mRNA des Androgenrezeptors eine Strukturveränderung bewirkt, welche spezifisch von Proteinen oder Nukleasen erkannt wird. Diese Proteine oder der mRNA-Proteinkomplex könnten dann Ziel von weiteren, am RNA-Abbau beteiligter Proteine sein, oder direkt von RNasen erkannt werden. Hierdurch wird ein schnellerer Abbau dieser mutierten mRNA eingeleitet, der zu einer verminderten Proteinmenge in den Zellen führt. Die verbleibende Konzentration an Androgenrezeptor scheint jedoch nicht auszureichen, um eine normale männliche Geschlechtsentwicklung aufrechtzuerhalten.

Weitere Untersuchungen die zur Aufklärung dieser Annahmen und zur Identifizierung des oder der spezifischen mRNA-bindenden Proteine führen, würden zu einem besseren Verständnis über die Funktion N-terminaler Bereiche des Androgenrezeptors beitragen und die Charakterisierung von Mutationen, die bei androgeninsensitiven Patienten gefunden werden, erleichtern.

4 Material und Methoden

Material

4.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30/0,8)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Agarose (<i>SeaKem LE</i>)	Biozym Diagnostik, Hameln
Aktivkohle	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumazetat	Merck, Darmstadt
Aminosäuren-Mix (ohne Methionin)	Promega, Madison, WI, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bakterien-Petrischalen (9cm)	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Bis-Benzimid (Hoechst Nr.33250)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Dialyseschläuche	Bender & Hobein, Karlsruhe
Digitonin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Easy-Pure	Biozym Diagnostik, Hameln
ECL- <i>Western-blotting detection reagents</i>	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
EGTA	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe

Ethidiumbromid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Filterpapier <i>Whatman 3MM</i>	Bender & Hobein, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycylglycin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
HEPES	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNA, Typ III	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lambda DNA	Gibco BRL Life Tech. LTD; Paisley, UK
Leupeptin	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
D-Luziferin <i>Firefly</i>	Biosynth AG, Staad, Schweiz
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Methanol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Nürtingen
MOPS	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
<i>Mounting medium</i>	Dako Corporation, USA
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Nukleotide (ATP, dA/G/C/TTP, ddA/G/C/TTP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Nutrient Broth	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Nylon-Membran (<i>Hybond N⁺</i>)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Oligo-dT-Zellulose	Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg

Paraformaldehyd	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Pepstatin	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Phenol	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyvinylid�n-Difluorid-Membran (Immobilon TM -P)	Millipore, Bedford, MA, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Rediprime Random Primer Labelling Kit</i>	Amersham-Buchler, Braunschweig
Retikulozytenlysate (aus Kaninchen)	Promega, Madison, WI, USA
Ribonuklease Inhibitor (<i>RNasin</i>)	Promega, Madison, WI, USA
Rinderserumalbumin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Röntgenfilme (<i>HyperfilmTMMP</i>)	Amersham-Buchler, Braunschweig
RPMI 1640 Kulturmedium	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
<i>Sequenase DNA Sequencing Kit</i>	United States Biochemicals, Cleveland, Ohio
Sterilfilter	Renner GmbH, Dannstadt
Szintillationsflüssigkeit (<i>Emulsifier-Safe</i>)	Packard Instr. Comp., Meriden, CT, USA
TEMED	Bio Rad Laboratories GmbH, München
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	Promega, Madison, WI, USA
Tris-HCl, Tris-Base	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triton X-100	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Tween 20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
tRNA (aus Hefe)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen

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

Radiochemikalien

γ - ³² P-dATP (370 MBq/ml)	Amersham-Buchler, Braunschweig
[α - ³² P] dCTP (370 MBq/ml)	Amersham-Buchler, Braunschweig

L-[³⁵ S]-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
¹⁴ C-methylierte Proteine als Molekulargewichts-Standard (185 kBq/ml)	Amersham-Buchler, Braunschweig

Enzyme

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

modifizierende Enzyme:

<i>Superscript</i> Reverse Transkriptase	Gibco BRL Life Tech., Eggenstein
DNA-Polymerase I (<i>Klenow-Fragment</i>)	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNAse A	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Sequenase</i> (modifizierte Form der T7-DNA-Polymerase)	United States Biochemicals, Cleveland, Ohio
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, WI, USA
T3 RNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T7 RNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Thrombin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

4.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, oder Birsner & Grob-Biotech GmbH, Denzlingen, oder Eurogentec, Frankreich bezogen.

Doppel- und Einzelstrangoligonukleotide für DNA- und RNA-Gelretardationsanalysen

Einzelsträngige (*single strand*) *androgen responsive element* (ssARE)) Oligonukleotide:

ssARE-A: 5'AGCTTAGAACACAGTGTTCTCTAGAG3'

ssARE-B: 5'GATCCTCTAGAGAACACTGTGTTCTA3'

Einzelsträngige Wildtyp (wt) und mutierte (m) RNA Oligonukleotide (abgeleitet von der cDNA-Sequenz des menschlichen Androgenrezeptors, Nukleotide 1777-1806):

wt-RNA-oligo: 5'GGCGAGGCGGGAGCUGUAGCCCCCUACGGCU3'

m-RNA-oligo: 5'GGCGAGGCGGAAGCUGUAGCCCCCUACGGCU3'

Oligonukleotid-Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Amplifikation N-terminal trunkierter Fragmente des menschlichen Androgenrezeptors:

5'Primer (enthalten *BamH I*-Adapter mit artifizieller Kozak-Sequenz, Kozak, 1989):

ARA320-Primer: 5'CCGGATCCACCATGACTGAGGAGAGCCTAGGCTGCTCTGGC3'

ARA340-Primer: 5'CCGGATCCACCATGACTGAGTCTACCCTGTCTCTCTACAAGT3'

3'Primer (abgeleitet von der cDNA-Sequenz des menschlichen Androgenrezeptors direkt hinter der *Hind III* Schnittstelle bei Aminosäure 565):

AR-Primer3: 5'TGCAGCTTCCACATGTGAGAGCTCCATAGTG3', hybridisiert 3' hinter einer *Hind III* Schnittstelle im Androgenrezeptor

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Mutagenese von internen Deletionsmutanten des menschlichen Androgenrezeptors:

5'Primer für die 1. PCR:

-AR-BstE II: 5'GCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGAC3', hybridisiert 5' vor einer *BstE II*- Schnittstelle im Androgenrezeptor

-AR del447/536(1): 5'CAGTTGTATGGACCGTGTATGCGTTTGGAGACTGCCAGGGA3'

-AR del488/536(1): 5'GGCTACACTCGGCCCCCTCAGGGGATGCGTTTGGAGACTGCCAGGGAC3'

-AR del440/473(1): 5'CACTCTCTTCACAGCCGAAGAGGCGGGAGCTGTAGCCCC TAC3'

-AR del510/536(1): 5'GTGTGGTACCCTGGCGGCATGGTGAGCAGAATGCGTTTGGAGACTGCCAGGGAC3'

3'Primer für die 1. PCR:

-AR Primer 3 (siehe oben)

-AR del447/536(2): 5'TCCCTGGCAGTCTCCAAACGCATACACGGTCCATACTG3'

-AR del488/536(2): 5'GTCCCTGGCAGTCTCCAAACGCATCCCCTGAGGGGGCCGAGTGTAGCC3'

-AR del440/473(2): 5'GTAGGGGGCTACAGCTCCCGCCTCTTCGGCTGTGAAGAGAGTGTG3'

-AR del510/536(2): 5'GTCCCTGGCAGTCTCCAAACGCATTCTGCTCACCATGCCGCCA

GGGTACCACAC3'

Als Primer für die 2. PCR wurden AR-BstE II und AR Primer 3 verwendet.

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation eines C-terminalen Fragments von NFI:

Beide Primer enthalten eine *BamH I* Schnittstelle, wodurch sie *in frame* in ein *BamH I* geschnittenes Plasmid kloniert werden können.

NF1/X 282-Primer: 5'CGGGATCCAAGCTTACCATGACTGAGGACGACAGTGAGATGGAGAGT3'

NF1/X 359-Primer: 5'TTGATCCTGGTCTGACTCCAGCAAGCACAGG3'

4.3 Plasmidkonstrukte

Reporter-gen-Plasmide für transiente Transfektionen:

pHCwt Luc (Heck et al., 1997)

450bp langes *Hind III/Bgl II* Fragment des MMTV-LTR vor dem *Firefly* Luziferase-Reporter-gen.

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

Position -517 bis +63 des menschlichen Kollagenase I-Gens vor dem Luziferase-Reporter-gen.

Expressionsplasmide für transiente Transfektionen:

pSG-5 (Green et al. 1988)

Expressionsvektor ohne cDNA des menschlichen Androgenrezeptors mit SV (simian virus) 40 Promotor.

pSG-5-ARwt (Kaspar et al., 1993)

Expressionsvektor mit cDNA des menschlichen Androgenrezeptors, zur Verfügung gestellt von H. Klocker, Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

pSG-5-AR-P

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des menschlichen Androgenrezeptors. Punktmutation (G->A) an Nukleotidposition 1786, welche zu einem Aminosäureaustausch von Glyzin zu

Glutaminsäure an Position 447 führt. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker, Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

pSG-5-AR-R615H

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des menschlichen Androgenrezeptors. Punktmutation (G->A) an Nukleotidposition 2206, welche zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 615 führt. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker, Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

pSG-5-AR-R617P

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des menschlichen Androgenrezeptors. Punktmutation (G->C) an Nukleotidposition 2212, welche zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin an Position 617 führt. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker, Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

Androgenrezeptor-Deletionsmutanten

pSG-5 Expressionsvektoren mit deletierten cDNAs des menschlichen Androgenrezeptors, die eine verkürzte Form des Androgenrezeptors ohne die angegebenen Aminosäuren ergeben.

Die Konstrukte AR Δ 473 und AR Δ 536 wurden in Gast et al., 1995 beschrieben.

Die Konstrukte AR Δ 188, AR Δ 320, AR Δ 340, AR Δ 440, AR Δ 488, AR Δ 510 und AR Δ 440-536, AR Δ 488-536, AR Δ 440-473 und AR Δ 510-536 wurden in Gast et al., 1998 (im Druck) beschrieben.

Die N-terminalen Deletionsmutanten wurden durch PCR-Amplifikation erhalten. Die 5' Primer die für die Amplifikation verwendet wurden (siehe 2.2) enthalten an ihrem Ende eine artifizielle Kozaksequenz (Kozak, 1989) mit einem neuen Transkriptionsstart und einer *BamH I* Schnittstelle. Der 3' Primer (siehe 2,2) enthält eine *Hind III* Schnittstelle, wodurch das erhaltene Fragment in die entsprechende Schnittstelle des Wildtyprezeptorkonstruktes kloniert werden konnte.

Die internen Deletionsmutanten wurden durch PCR-Mutagenese, mit jeweils zwei PCR Ansätzen, konstruiert. In der ersten PCR-Runde wurden mit den entsprechenden Primern (2.2) zwei Fragmente erhalten. Diese wurden hybridisiert und als Vorlage in der zweiten Runde verwendet. Das erhaltene Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *BstE II* geschnitten und in die entsprechende Stelle des Wildtyprezeptorkonstruktes kloniert.

Androgenrezeptor-Fusionsmutanten

pSG-5 Expressionsvektor mit deletierten cDNAs des menschlichen Androgenrezeptors N-terminal fusioniert mit einer 77 Aminosäuren langen C-terminalen Sequenz des Transkriptionsfaktors NF-1 (*nuclear factor 1*, Nebl et al., 1995)

Die chimären Konstrukte **AR Δ 473/NF1X3**, **AR Δ 510/NF1X3** und **AR Δ 536/NF1X3** wurden in Gast et al., 1998 (im Druck) beschrieben.

Die Konstrukte wurden durch PCR-Amplifikation einer C-terminalen Region von NF-1 mit RSV-Gal4-NF1/X3 (Nebl et al., 1995) als Vorlage und den entsprechenden Primern (2.2) hergestellt, wobei das PCR-Produkt mit *BamH I* geschnitten und in die entsprechende Stelle von AR Δ 473, AR Δ 510 und AR Δ 536 kloniert wurde.

Plasmide für die Produktion von β -Gal-*Histaq*-Fusionsproteinen

p7ZfGalJc38T7 (Gal-SV40NLS)

β -Galaktosidase fusioniert mit dem Kernlokalisationsignal des *SV40 large T-antigen* (zur Verfügung gestellt von Martin Göttlicher, Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe).

Die Expressionsvektoren **β -Gal-ARwtNLS** (Gal-ARwtNLS), **β -Gal-AR-615NLS** (Gal-AR-615NLS) und **β -Gal-AR-617NLS** (Gal-AR-617NLS) wurden von A.C.B. Cato zur Verfügung gestellt. Sie kodieren für β -Galaktosidase, fusioniert mit dem Wildtyp-Kernlokalisationsignal des Androgenrezeptors (oder den angegebenen Mutationen) und einem *Histaq* (His6) vom Plasmid pRSET C (Invitrogen). Die Kernlokalisationssequenzen wurden durch Amplifikation eines 89 Aminosäuren (AA 578-667) überspannenden Fragments mit den Expressionsvektoren pSG-5-ARwt, pSG-5-AR-R615H und pSG-5-AR-R617P als Vorlage erhalten. Der verwendete 5'Primer enthielt eine *Bam H I* und der 3'Primer eine *Xho I* Schnittstelle, worüber das PCR-Fragment in die entsprechende *Bam H I/Xho I* Schnittstelle von pKW 321 (pRSET C plus β -Galaktosidase, erhalten von Karsten Weis, EMBL, Heidelberg) kloniert werden konnte.

Die Plasmide besitzen einen durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induzierbaren Promotor (*Tac*-Promotor), wodurch sie in *E. coli* exprimiert (siehe 2.21) werden können.

Außerdem enthalten sie auch den Promotor für T7-DNA-Polymerase, weshalb sie *in vitro*, mit Hilfe des *TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega), transkribiert und translatiert werden können (siehe 2.21).

Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen:

Das bakterielle Expressionsplasmid für GST (**pGEX 4T1**) wurde von Pharmacia Biotech. GmbH, Freiburg erworben.

pGEX4T1-hSRP1 α (GST-Importin- α), welches die cDNA für das menschliche Importin- α enthält, wurde von A.C.B. Cato zur Verfügung gestellt. Es wurde durch Umklonierung aus pHishSRP1 α (zur Verfügung gestellt von Karsten Weis; Weis et al., 1995) in pGEX 4T1 erhalten.

NTF97pGEX4T1 (GST-Importin- β), welches die cDNA für Importin- β aus Rindern, enthält wurde von Stephen A. Adam, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois zur Verfügung gestellt.

Durch Induktion des *Tac*-Promotors dieser Plasmide mit IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid) konnten die Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden (siehe oben und 2.21).

Sonden für RNA-Hybridisierungen

GAPDH (Ratte)

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

AR (Mensch)

1.8 kb *BamH I/Asp 718* Fragment aus pSG-5-ARwt (Kaspar et al., 1993)

Neomycin (Bakterien)

0.8 kb *Bgl II/BamH I* Fragment aus pSV₂neo Plasmid (Beck et al., 1982)

4.4 Antikörper

SP061

Polyklonaler Antikörper gegen die N-Terminale Domäne des menschlichen Androgenrezeptors, Epitop: Aminosäuren 301-320; erhalten von A.O. Brinkmann, Rotterdam (van Laar et al., 1989).

SP066

Polyklonaler Antikörper gegen die C-Terminale Domäne des menschlichen Androgenrezeptors, Epitop: Aminosäuren 899-917; erhalten von A.O. Brinkmann, Rotterdam (Kuiper et al., 1993).

F 39.4.1

Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen die N-Terminale Domäne des menschlichen Androgenrezeptors, Epitop: Aminosäuren 301-320; erworben bei BioGenex Laboratories, Hamburg.

β -Gal-Antikörper

Monoklonaler Maus-anti- β -Gal Antikörper (Boehringer).

Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

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

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

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen

TRITC-markierter Anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Dianova)

Sekundärantikörper für Kernimportanalysen

FITC-markierter Anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Dianova)

4.5 Bakterien

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

Beschrieben in Studier et al., 1990.

E. coli DH 5 α (für Klonierungen)

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

4.6 Zelllinien und Kulturbedingungen

Cos-7

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

CV-1

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

LNCaP

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

VHF 72

Primäre menschliche Genitalhautfibroblasten aus Kontrollpatienten (enthalten Wildtyp Androgenrezeptor); kultiviert in DMEM mit 10% FCS. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

VHF 103

Primäre menschliche Genitalhautfibroblasten (enthalten mutierten Androgenrezeptor) von Patient P. vor Hormonbehandlung, kultiviert in DMEM mit 10% FCS. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

VHF 131

Primäre menschliche Genitalhautfibroblasten (enthalten mutierten Androgenrezeptor) von Patient P. nach einjähriger Hormonbehandlung, kultiviert in DMEM mit 10% FCS. Zur Verfügung gestellt von H. Klocker Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck, Österreich.

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

Methoden

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

4.7 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung nukleinsäurehaltiger Lösungen von Proteinen wurde das Volumen mit Wasser auf mindestens 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1xTNE gesättigt, 1xTNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0), gutem Mischen, Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und erneutem Mischen wurden die Phasen durch 5 minütige Zentrifugation bei 10.000 g getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und nochmals mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 3 M NaAzetat, pH 4,8 bis zu einer Endmolarität von 0,3 M versetzt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens 100% Ethanol wurde 20 min bei -80°C bzw. 2 h bei -20°C gefällt und anschließend 20 min bei 10.000 g zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde der Niederschlag mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und im Vakuum (*SpeedVac* Evaporator, Savant) getrocknet.

Bei der Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde die Ethanolfällung durch eine Isopropanolfällung ersetzt. Zur wässrigen DNA-Lösung wurden bei Raumtemperatur 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und der Niederschlag sofort abzentrifugiert.

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren wurden in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer (*Spekol UV/VIS*, Zeiss) gemessen. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide.

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

4.8 DNA-Klonierungstechniken

Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für den Verdau von 0,5-1 µg DNA wurden, abhängig vom jeweiligen Enzym und von den Pufferbedingungen, 2 bis 4 Enzymeinheiten (eine Enzymeinheit entspricht der Enzymmenge die in einer Stunde 1 µg DNA des Phagen Lambda vollständig verdaut) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zehnfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung und die Inkubationszeit 2-3 h bis über Nacht. Bei Plasmid-DNA aus Minipräparationen wurde der Reaktion 0,5 µg/µl RNase A zugesetzt.

Durch Zugabe von 5xLadepuffer (50% Glyzin, 50 mM EDTA pH 8,0, 2% SDS, je 1mg/ml Bromphenolblau und Xylencyanol) wurde der Verdau abgestoppt und zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8-2% Agarose in 50 ml 1xTBE (90 mM Tris pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA) durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Der Gellösung wurden 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt, bevor sie in die Gelapparatur gegossen wurde. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen für die

aufzutragenden Proben ausgespart. Nach Erhärten der Agarose, Herausziehen des Kammes und Beschicken der Gelapparatur mit Elektrodenpuffer (1xTBE), wurde diese an die Elektroden angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V.

Danach konnten die Nukleinsäure-Fragmente durch Fluoreszenz unter einem UV-Transilluminator (*IL-350M*, Bachofer) sichtbar gemacht und photographiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Identifizierung der interessierenden DNA-Bande unter UV-Licht, wurde diese mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit dem dreifachen Volumen SALT-Puffer (EASYPURE DNA Purification Kit, Biozym) versetzt und bei 55°C 5 min geschmolzen. Durch Zugabe von BIND (5µl+1µl/µg DNA) und 5 min Inkubation bei RT unter häufigem Mischen, wurde die DNA gebunden. Nach 5 s Zentrifugation wurde das Sediment in 1 ml WASH resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 s wurde der Überstand verworfen und nochmals zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde entfernt, das Sediment getrocknet und mit einer geeigneten Menge an deionisiertem Wasser resuspendiert. Nach einer fünf minütigen Inkubation wurde 1 min bei 10000 g zentrifugiert und der DNA enthaltende Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch eine weitere Zentrifugation konnten Reste von BIND entfernt werden. Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurde ein drei- bis fünffacher molarer Überschuß des zu inserierenden Fragmentes zum entsprechend vorbereiteten Vektor gegeben. Mit je 2 Einheiten T4-DNA-Ligase wurde in einem Endvolumen von 20 µl Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 5 mM ATP) über Nacht bei 15°C inkubiert. Bei Ligation von DNA-Fragmenten mit "glatten" Enden wurde die doppelte Menge Ligase eingesetzt. Zur weiteren Analyse wurden 5 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

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

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

Präparation von kompetenten Bakterien (Hanahan, 1986)

Ein Milliliter einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α wurde zu 100 ml SOB gegeben und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,35 wachsen lassen; dann wurden die Bakterien auf zwei neue Gefäße verteilt und für 10 min auf Eis gestellt, anschließend bei 800 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment auf Eis vorsichtig mit je 5 ml STB resuspendiert; darauf wurden weitere 5 ml STB dazugegeben und die Suspensionen 15 min auf Eis gestellt. Dann wurde erneut wie oben zentrifugiert und das Bakteriensediment auf Eis mit je 2 ml STB resuspendiert und mit weiteren 2 ml STB versetzt. Diese Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in Gefäße aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1986)

Zweihundert Mikroliter kompetente Bakterien wurden mit 5 μ l des Ligationsansatzes oder 5 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 30-60 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Bakterien suspension 3 min bei 42°C hitzebehandelt und sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurden 2 ml Bakterienmedium (LB oder NB ohne Ampicillin) zu den Bakterien gegeben und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert und anschließend 1/10 des Volumens (1x) nach Zentrifugation das Bakteriensediment auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert (9x). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und ein Teil der gewachsenen Bakterienklone für DNA-Präparation verwendet.

4.9 Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxipräp")

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

250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in Selektionsmedium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 100 μ g/ml Ampicillin) wurden 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und nach Zugabe von RNase A (Endkonz. 50-100 μ g/ml) etwa 5 min bei RT belassen. Anschließend wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT und gleichzeitigem vorsichtigem Schwenken der Suspension wurden 10 ml Puffer 3 (2,6 M KAc, pH 4,8) dazugegeben und für mindestens 10 min auf Eis gestellt; anschließend wurde die Suspension bei 15.000 g zentrifugiert; der Überstand wurde nochmals für 5 min zentrifugiert und schließlich 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* (1 M NaCl, 50 mM 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 13.000 g abzentrifugiert und nach Waschen mit 70%igem Ethanol getrocknet, in Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Minipräp")

Bakterienklone von Selektiv-Agarplatten wurden in 2 ml Selektionsmedium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 150 µl GTE (50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 7,8) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) und mindestens einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 150 µl 3 M NaAc wurde die Suspension für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt, kräftig gemischt und erneut für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße mit 1 ml Ethanol (-20°C), gegeben und erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser aufgenommen. Davon wurden 10 µl in einem Restriktionsverdau verwendet.

4.10 Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte

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

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode mit Hilfe eines *Sequenase-Kit* (USB).

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

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

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

*Zusammensetzung der Terminationsmischungen:

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

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

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

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

Auftrennung der Sequenzierreaktionen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

(Bio Rad) getrocknet. Das Gel wurde anschließend über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert.

4.11 Radioaktive Markierung und Reinigung von Sonden für RNA-Hybridisierungen

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für Hybridisierungen wurde mit Hilfe des *Rediprime Random Primer Labelling Kit* (Amersham) durchgeführt. Hierzu wurden 25 ng DNA-Fragment in 45 μl deion. Wasser 5 min auf 95°C erhitzt und dann bei RT kurz abgekühlt. Die denaturierte DNA-Lösung wurde in die von Amersham vorbereiteten Eppendorfgefäße pipettiert und gemischt (die Eppendorfgefäße enthalten dNTPs (außer dCTP), *Klenow*-DNA-Polymerase, *Random-Primer* und den Reaktionspuffer). Dann wurden 3 μl [α - ^{32}P] dCTP zugegeben und bei 37°C 10-30 min inkubiert. Hierbei findet ausgehend von den Primern die Synthese des neuen Doppelstranges statt, welcher durch den Einbau des [α - ^{32}P] dCTP radioaktiv markiert ist.

Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Die Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des *QIAquickTM Nucleotide Removal Kit* von Qiagen durchgeführt. Zu der Reaktion wurde das 10 fache Volumen von Puffer *PN* zugegeben und dann auf eine *Qiagen spin column* aufgetragen, welche in einem Auffanggefäß plaziert war. Dann wurde 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann zweimal mit 500 μl von Puffer *PE* gewaschen und 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 100-200 μl deion. Wasser eluiert und konnte nun bei -20°C gelagert werden. Bevor das markierte Fragment als Sonde in einer Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde seine Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Kontron Analytical, Schweiz) bestimmt.

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

Präparation von polyA⁺ RNA aus Zellen

Zur Präparation von polyA⁺ RNA aus Zellen wurden je 2×10^6 Zellen auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät und für 24 h in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Bei transienten

Transfektionen wurden die Zellen mit je 30 µg Expressionsplasmid durch Elektroporation transfiziert (siehe 2.16). Danach wurden die Zellen mit Hormon (10^{-7} M Endkonzentration) oder der entsprechenden Menge Ethanol für weitere 24 h behandelt. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen und in 10 ml sterilem STE (20 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS, 300 µg/ml Proteinase K) abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA der Zellen wurde mit Hilfe eines *Ultra-Turax*TM-Homogenisators (Janke u. Kunker GmbH & CoKG) für 30 s geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die NaCl-Konzentration auf 0,5 M eingestellt wurde, wurde pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS) zugegeben. Unter ständigem Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur konnte die polyA⁺ RNA an die Oligo-dT-Zellulose binden. Die Oligo-dT-Zellulose wurde durch wiederholtes Zentrifugieren für 2 min bei 1000 g dreimal mit HSB gewaschen. Die Elution der polyA⁺ RNA erfolgte durch wiederholtes Zentrifugieren (dreimal mit 1 ml und einmal mit 0,5 ml H₂O). Zur vollständigen Entfernung der Oligo-dT-Zellulose wurden die 3,5 ml eluierte polyA⁺ RNA nochmals für 5 min bei 2000 g abzentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde mit 500 µl des Eluats spektralphotometrisch bestimmt. In den verbleibenden 3 ml RNA wurden die NaAc-Endkonzentration mit 3 M NaAc, pH 4,8 auf 0,2 M eingestellt und zusammen mit Hefe-tRNA (1 µg/ml) als Fällungshilfe und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA bei 10.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, das Sediment an der Luft getrocknet und in H₂O resuspendiert (Endkonzentration ca 0,5 µg/µl). Die RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1% horizontalen Agarosegelen. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1xMOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAzetat, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 5 µl Ethidiumbromid und 5 ml Formaldehyd (37%) gemischt. Das Gel wurde in eine horizontale Kammer gegossen, wobei mit Hilfe eines Kammes Taschen für das Auftragen der Proben ausgespart wurden. Als Laufpuffer diente 1xMOPS-Puffer. 5 µg polyA⁺ RNA wurden in 20 µl RNA-Probenpuffer (17,6% Formaldehyd, 50% rekristallisiertes Formamid, 5% Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau in MOPS-Puffer) 10 min auf 55°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 8 cm weit gewandert war. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel unter einem UV-Transilluminator (*IL-350M*, Bachofer) photographiert und die Lage der 28S und 18S

ribosomalen RNA markiert, bevor es zur weiteren Analyse der RNA für den *Northern-Blot* verwendet wurde.

***Northern-Blot* und Hybridisierung**

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

Nach beendetem Transfer wurde auf der Membran die Position der Probestaschen sowie der 28S und 18S ribosomalen RNA markiert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht für 35 s in einem *Stratalinker 2400* (Stratagene) wurde die RNA kovalent an die Membran fixiert.

Zur Detektion einer bestimmten mRNA wurde die Membran mit einem für die mRNA spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Fragment hybridisiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Vorhybridisierung der Membran für 2 h im 65°C-Wasserbad in 200 ml Vorhybridisierungs-Lösung (4xSSC, 3,3% PiPPi*, 1xDenhard's Lösung**, 0,1% (w/v) SDS). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde zerkleinerte denaturierte Lachsspermien-DNA in einer Endkonzentration von 20 µg/ml für eine Stunde zugesetzt. Für die Hybridisierung wurde die Membran dann luftblasenfrei in einen Plastikbeutel mit Hybridisierungs-Lösung eingeschweißt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Hybridisierungs-Lösung enthielt in der Regel 3×10^6 cpm/ml der radioaktiv markierten DNA-Sonde (10 min bei 95°C denaturiert) in 4xSSC, 10 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS und 20 µg/ml Lachsspermien-DNA. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran nach der Inkubation unter Schütteln bei 65°C jeweils 30 min in Waschlösung 1-4*** gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit einer Verstärkerfolie einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

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

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

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

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

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

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

4.13 Analyse von RNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR)

Präparation von gesamter RNA aus Zellen

Für die Präparation von gesamter RNA wurden ca. 5×10^5 Zellen auf 10 cm Petrischalen ausgesät, nach 24 h wurden sie induziert (siehe oben) und weitere 24 h kultiviert. Für die Ernte wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, dann 4 ml *peqGOLD TrifastTM* (Phenol und Guanidinisothiocyanat in Lösung, peqLAB) zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die Proben wurden dann für 5 min bei RT inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 0.8 ml Chloroform, vortexten und Inkubation für 10 min bei RT wurden die Proben für 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Dies führte zur Trennung in eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, in eine Interphase und in eine obere, die RNA enthaltende, wässrige Phase. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und mit 2 ml Isopropanol gevortext. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde für 10 min bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Präzipitat 2x mit 75% Ethanol gewaschen. Die gesamte RNA wurde in RNase freiem deionisiertem Wasser aufgenommen, die Konzentration spektralphotometrisch gemessen und bei -80°C gelagert.

Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Für die Erststrangsynthese wurden 1 µg RNA mit 200 ng Oligo-(dT)₁₂ Primer in einem Volumen von 12 µl bei 70°C für 10 min inkubiert und danach auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrang-Puffer (GibcoBRL), 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10mM dNTP Mix (10mM von dATP, dGTP, dCTP und d TTP) und 1 µl (200U) *SUPERSCRIPT^{TMII}* (GibcoBRL) wurde bei 42°C für 50 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert.

Amplifikation der Erststrang-cDNA mittels PCR

Es wurden 1 µl Erststrang-cDNA mit 1 µl 10x*Taq*-Polymerase-Puffer (Pharmacia), je 12,5 pmol 3'-und 5'-Amplifikations-Primer, 1 µl dNTP Mix (2 mM) und 0,5 Einheiten *Taq*-DNA Polymerase mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Amplifikation der Erststrang-cDNA erfolgte durch 25 Zyklen folgender Reaktionsbedingungen: 1 min, 94°C, 1 min, 50°C und 1 min, 72°C.

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und photographiert. Mit Hilfe des PC-Programms *ONEdScan* konnten die Fragmente semiquantitativ analysiert werden.

4.14 Zellkultur

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen oder -flaschen kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten an einer Sterilbank (Glatt AG). Medien, Puffer und Glaswaren für die Zellkultur wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C, 1,4 bar, 20 min).

Kultivieren und Trypsinieren von Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz von der Kulturschale abgelöst und mit geringerer Dichte wieder ausgesät. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Das Medium wurde abgesaugt, die Schale mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und 0,25% Trypsinlösung (0,1 ml/cm Kulturschale) auf die Zellen gegeben. Die Schale wurde bei 37°C in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale ablösten (1-10 min). Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium abgespült, resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde eine Zellsuspension logarithmisch wachsender Zellen 3 min bei 500 g zentrifugiert und das Sediment in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen überführt und mindestens 1 h auf Eis gestellt. Dann wurden die Röhrchen in einer Styroporbox (um ein langsames Einfrieren zu ermöglichen) bei -80°C eingefroren und spätestens nach einer Woche in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch in einem 37°C Wasserbad. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, bei 500 g zentrifugiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf Platten ausgesät. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt.

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

Mit dieser Methode wurde fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) über Aktivkohle gereinigt, um im Serum noch vorhandene Hormone zu entfernen. Hierzu wurden 50 ml dextrangebundene Aktivkohle (25 g Aktivkohle, 2,5 g Dextran, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 pro Liter H₂O) für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu diesem Aktivkohlesediment wurde 250 ml FCS gegeben, resuspendiert und die Lösung 30 min im 56°C Wasserbad geschüttelt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g wurde die Aufreinigung mit dem Überstand wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g wurde das von Hormonen gereinigte Serum sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.15 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951)

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

Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 7-10% Trenngel und einem 5% Sammelgel und wurden zwischen zwei, durch Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen mit Agarose abgedichtet. Für eine 10% Trenngel-Lösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS und 10% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1% (w/v) APS und 0,05% TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen. Bis zum Auspolymerisieren wurde es mit Isopropanol überschichtet. Für die 5% Sammelgel-Lösung wurden 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED vermischt. Das Sammelgel wurde (nach Entfernen des Isopropanols) auf das Trenngel

gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Laemmli-Probenpuffer (80 mM Tris pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% Glycerin, 2% β -Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Sigma Chemie GmbH) mit vorgefärbten Proteinen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS) bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann bei 30 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Wurden ^{35}S -Methionin markierte Proteine aufgetrennt, so wurde das Gel auf *Whatman 3MM* Papier aufgezogen und auf einem Geltrockner (Bio Rad) getrocknet. Das Gel wurde dann über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert. Ansonsten wurden nach der Elektrophorese die Proteine im Gel entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt oder auf eine PVDF-Membran übertragen.

Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Durch die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung wurden Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau, 50% Methanol und 7,5% Essigsäure) geschüttelt. Die Entfärbung erfolgte in 50% Methanol und 7,5% Essigsäure für mehrere Stunden, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel auf *Whatman 3MM* Papier auf einem Geltrockner (Bio Rad) getrocknet.

4.16 Transiente Transfektionen

Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973)

CV1-Zellen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Petrischale 24 h vor der Transfektion in entsprechendem Kulturmedium mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin ausgesät. Für die Herstellung des Präzipitats wurden alle Lösungen (außer der DNA) auf 37°C vorgewärmt. Falls nicht anders vermerkt, wurden jeweils 10 μg Plasmid-DNA pro Kulturschale transfiziert. (Betrag die zu transfizierende DNA-Menge weniger als 10 μg , so wurde die Differenz durch Kotransfektion eines "Leervektor"-Kontrollplasmids aufgefüllt.) Die Präzipitatbildung wurde in einem Volumen von 500 μl pro Kulturschale durchgeführt. Hierzu wurde die DNA zunächst mit H_2O verdünnt (H_2O -Volumen: 250 μl abzüglich der Volumina

der DNA- und der CaCl₂-Lösung). Dann wurden 250 µl 2xHBS (274 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1 mM D-Glucose, 40 mM HEPES, pH 7,05) zugegeben und die Lösung gut gemischt. Unter Schütteln wurden dann 25 µl 2,5 M CaCl₂ zugetropft und bis zur Bildung des Präzipitats für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat (500 µl) wurde zu 8 ml Medium einer Kulturschale zugetropft und 5 bis 6 h auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden für 2 min mit 4 ml 15% Glycerin in PBS geschockt, anschließend zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und 8 ml frisches Medium mit den entsprechenden Agenzien zugegeben. Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen nach ca. 40 h geerntet.

Elektroporation (Eul et al., 1989)

Es wurden je 2×10^6 Cos7-Zellen pro Petrischale 24 h zuvor ausgesät. Alle Lösungen für die Elektroporation wurden auf 37°C vorgewärmt. Für die Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, bei 400 g zentrifugiert und in 1xHBS für Elektroporationen (20 mM Hepes, 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM Glukose, pH 7,1) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl/Ansatz aufgenommen und in 0.2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Nach Zugabe von 15 µg der entsprechenden DNA wurden die Küvetten auf Eis inkubiert. Nach etwa 5 min wurde mit dem Bio-Rad Genepulser-Apparatus bei 200 Volt und 500 µF elektroporiert. Die Zellen blieben noch 5 min auf Eis und wurden dann in frischem DMEM (mit 10%FCS und 1% P/S) auf Perischalen verteilt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und Hormon bis zur Endkonzentration 10^{-7} M, bzw. die entsprechende Menge Ethanol, zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet.

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

Präparation von Proteinextrakten für Luziferase-Analysen

Die transient mit einem Luziferase-Reportergen kotransfizierten Zellen einer 10 cm Kulturschale wurden nach ihrer Behandlung mit Induktoren zweimal mit kaltem PBS ohne Kalzium und Magnesium (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen, 400 µl eiskalter Lysispuffer (0,1 M Tris-Azetat pH 7,5, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100) zugegeben und die Schalen für 15 min unter gelegentlichem Schwenken bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen im Lysispuffer mit einem Gummischaber auf Eis abgeschabt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Nach starkem Vortexen wurde das Zelllysate zum Abtrennen der Zelltrümmer 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige

Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, seine Proteinkonzentration bestimmt und direkt für den Enzymtest verwendet.

Luziferase-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Luziferase-Enzymaktivität wurde von allen Proben die gleiche Proteinmenge (200 µg) für die Reaktion eingesetzt. Hierzu wurde pro Probe die entsprechende Menge an Proteinextrakt mit 350 µl Reaktionspuffer (25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT, pH 7,8) und 100 µl Luziferin-Lösung (Substrat) (0,2 mM Luziferin in 25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, pH 7,8) versetzt. Das bei der Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin freigesetzte Licht wurde dann für 10 s bei 560 nm in einem Luminometer (*Lumat LB9501*, Berthold) gemessen und die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) als Maß der Luziferase-Aktivität dokumentiert.

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

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

Für *Western-Blot*-Analysen wurden je 5×10^5 Zellen in ihrem jeweiligen Medium auf 10 cm Kulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde für die angegebenen Zeiten und den entsprechenden Hormonkonzentrationen behandelt. Kontrollzellen wurde mit äquivalenten Ethanolmengen behandelt. Zur Ernte wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 300 µl 2xLaemmli-Probenpuffer (0,16 M Tris pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% Glycerin, 4% β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) abgeschabt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zum Scheren der DNA wurden die Proben sonifiziert (*Branson Sonifier*, G. Heinemann) und die Zelltrümmer 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert. 50 µl jeder Probe (gleiche Proteinkonzentration) wurden in einem 7-10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (SDS-PAGE). Nach der Auftrennung wurde ein Teil des Gels, der nicht auf eine Membran transferiert werden sollte, mit Coomassie-Blau gefärbt, um die eingesetzten Proteinmengen zu vergleichen. Der Gelbereich mit dem interessierenden Protein wurde für den *Western-Blot* verwendet.

Western-Blot und Protein-Detektion auf Membranen

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransfer-Kammer (*Trans-Blot*, Bio Rad) auf eine PVDF-Membran (*Immobilon™-P*, Millipore)

übertragen. Zuvor wurde die Membran ca. 1 min in Methanol aktiviert und anschließend 10 min gewässert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran dann direkt zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je drei Lagen *Whatman 3MM*-Papier feucht in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glyzin, 20% Methanol) zusammengebaut. Der Transfer erfolgte entweder in 6 h oder über Nacht bei 4°C und 300 mA.

Nach beendetem Transfer wurde die Membran (mit den gebundenen Proteinen) kurz in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran kurz in PBS/0,15% Tween 20 gewaschen, mit dem jeweiligen Primärantikörper (ca. 1:1000 verdünnt 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 dreimal für 10 min in PBS mit 0,3% Tween 20 gewaschen und mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (ca. 1:5000 verdünnt in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20) analog zur ersten Hybridisierung für 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS mit 0,3% Tween 20 wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran mit 3 ml einer frisch bereiteten 1:1-Mischung der ECL *Western-Blot* Nachweisreagenzien (*Amersham*) beschichtet und in Folie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurde so lange ein Röntgenfilm exponiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

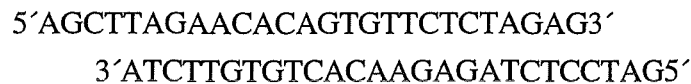
4.19 Analyse von Protein-DNA-Interaktionen

Präparation von Proteinextrakten für Gelretardationsanalysen

Cos7-Zellen wurden wie bereits beschrieben gewaschen, mit eiskaltem PBS abgeschabt, abzenrifugiert und das Sediment, je nach Größe, in 30-50 µl Extraktionspuffer (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 400 mM KCl, 15% Glycerin, pH 7,4) mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 10 µg/ml Antipain/HCl, 1 µg/ml Leupeptin, 0,6 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM DTT) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Inkubation in flüssigem Stickstoff lysiert, auf Eiswasser aufgetaut und bei 4°C zentrifugiert.

Herstellung des doppelsträngigen Oligonukleotids ARE für DNA-Gelretardationsanalyse

Gleiche Mengen (meist je 500 ng) der Einzelstrangoligonukleotide ssARE-A und ssARE-B wurden in einem Volumen von 100 µl in H₂O auf 95°C erhitzt und bei RT langsam abgekühlt. Hierbei hybridisieren die beiden Einzelstrangoligonukleotide zu einem Doppelstrangoligonukleotid, wie unten schematisch dargestellt.



Radioaktive Markierung des DNA-Oligonukleotids

In einem Volumen von 30 µl wurden etwa 60 ng des doppelsträngigen Oligonukleotids mit 3 µl Polynukleotidkinasen-Puffer, 3 µl [γ -³²P] dATP und 10 Einheiten T4-Polynukleotidkinase gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden nochmals 10 Einheiten der Kinase zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert.

Die Reinigung des radioaktiv markierten Oligonukleotids erfolgte wie in 2.11.

DNA-Gelretardationsanalyse (Barberis et al., 1987)

Es wurden 30 ml Lösung für ein 4% Acrylamidgel aus folgenden Substanzen hergestellt: 18,5 ml H₂O, 7,5 ml 1x TBE (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA), 4,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 300 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung (APS), 30 µl TEMED. Die Lösung wurde zwischen zwei 14 x 15 cm Glasplatten, die durch 1 mm dicke Abstandhalter getrennt waren, gegossen, ein Kamm eingesetzt und mit Klammern fixiert. Der Kamm wurde nach der Polymerisation entfernt, und das Gel in eine Gelapparatur eingespannt. Wenn nicht anders vermerkt wurden 20 µg Proteinextrakt (max. 4 µl) mit 10 µl 2xGRBB-Puffer (20 mM Hepes pH 7,9, 2 mM EDTA, 2mM DTT, 8% Ficoll) ohne KCl, 2 µg Poly dI/dC, auf 19 µl mit H₂O aufgefüllt, gemischt, und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 µl, etwa 20.000 cpm, eines ³²P-markierten Oligonukleotids (2-10 fmol) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Antikörperreaktionen wurden 1 µl desselben kurz vor Zugabe des radioaktiven Oligonukleotids zupipettiert. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, dieses mit 0,25xTBE Laufpuffer beschickt, und die DNA-Protein-Komplexe bei 100 Volt etwa 1,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde auf *Whatman 3MM* Papier getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert

4.20 Analyse von Protein-RNA-Interaktionen

Präparation von Proteinextrakten für RNA-Gelretardationsanalysen

Gesamtzellextrakte aus Cos-7 Zellen wurden wie in 2.19 präpariert.

Die Präparation von zytoplasmatischem und Kern-Zellextrakten wurde bei Schreiber et al., 1989 beschrieben. Ca. 4×10^6 Cos-7 Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und bei 500 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 400 μ l Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 25 μ l einer 10%igen Lösung von Nonidet NP-40 (Fluka) zugegeben und für 10 s gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 30 s wurde der Überstand mit dem zytoplasmatischen Extrakt in neue Eppendorfröhrchen aliquotiert und bei -80°C für eine weitere Verwendung eingefroren. Das Kernsediment wurde in 50 μ l eiskaltem Puffer C (10 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) resuspendiert und für 15 min bei 4°C stark geschüttelt. Der Kernextrakt wurde für 15 min bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Radioaktive Markierung von RNA-Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung von RNA-Oligonukleotiden erfolgte wie in 2.19.

Die Reinigung des radioaktiv markierten Oligonukleotids erfolgte wie in 2.11.

RNA-Gelretardationsanalyse

Die RNA-Gelretardationsanalyse wurde wie die DNA-Gelretardationsanalyse (2.19) durchgeführt, mit folgenden Veränderungen: Die Proben wurden auf ein 3.5-4% Acrylamidgel geladen; pro Ansatz wurden etwa 100 μ g Proteinextrakt und 50-100.000 cpm der radioaktiv markierten RNA-Oligonukleotide eingesetzt.

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

In vitro Transkription/Translation und Verdau von Proteinen

Mit Hilfe des *TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) konnten die verschiedenen verwendeten Proteine *in vitro* exprimiert, und mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert werden.

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l H_2O mit folgenden Komponenten:

25 μ l *TNT* Retikulozytenlysat aus Kaninchen;

- 2 µl TNT Reaktionspuffer;
- 1 µl TNT RNA Polymerase (T3 oder T7);
- 1 µl Aminosäuren-Lösung (ohne Methionin, 1 mM);
- 4 µl L-[³⁵S]-Methionin;
- 1 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl);
- 1 µg cDNA enthaltendes Plasmid.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis gemischt und 1-2 h bei 30°C inkubiert. Androgenrezeptorproteine wurden danach für 10 min bei RT mit DHT (Endkonzentration 10⁻⁷M) aktiviert. Je 2µl wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, getrocknet und autoradiographiert, der Rest wurde im Experiment eingesetzt.

Für den Trypsinverdau wurden je 10 µl der *in vitro* translatierten Proteine mit den verschiedenen angegebenen Endkonzentrationen (0-5 µg/µl) für 10 min bei 37°C inkubiert. Für den Verdau mit Extrakten aus Cos-7 Zellen wurden je 10 µl *in vitro* translatierter Proteine mit je 10 µl Cos-7 Extrakt (ohne Proteaseinhibitoren) für die angegebenen Zeiten (0-60 min) bei 37°C inkubiert.

Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen

Die Produktion eukaryontischer Proteine wird durch die Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* ermöglicht. Dadurch lassen sich große Mengen an löslichem Protein in Bakterien exprimieren (Smith und Johnson, 1988). Für die Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellem Rohlysat 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.

100 ml einer stationären Kultur dieses Bakterienstammes wurde mit 2xTY-Selektionsmedium (2% Hefeextrakt, 4% (w/v) Bacto-Trypton, 2% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) auf 1 Liter verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Expression des Fusionsproteins in den Bakterien durch Zugabe von 0,1-0,5 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 ohne Kalzium und Magnesium (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) mit 2 mM EDTA und 2 mM PMSF resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch Sonifizieren (*Branson Sonifier*, G. Heinemann) 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 ohne Kalzium und Magnesium) für 1 h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml eiskaltem PBS (ohne Kalzium und Magnesium) wurde die Glutathion-Agarose mit den gebundenen Fusionsproteinen auf eine Säule transferiert. Das Fusionsprotein wurde mit 9 ml 5 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris pH 8,0) in 1 ml Fraktionen bei 4°C aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel 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 Probe des Fusionsproteins zur Konzentrationsbestimmung nochmals in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit definierten Mengen BSA als Standard aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Durch Vergleich der Bandenintensitäten wurde die Konzentration des Fusionsproteins abgeschätzt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde mit 10% Glycerin und 1 mM DTT versetzt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

GST konnte bei Bedarf vom Fusionsproteinen abgespalten werden. Hierfür wurden die GST-Proteine an Glutathion-Agarose immobilisiert und auf eine Säule geladen. 1 ml einer Thrombinlösung (10 Einheiten/µg Fusionsprotein) wurde in PBS zugegeben. Die Spaltungsreaktion wurde über Nacht bei RT inkubiert, das freie Fusionsprotein aufgefangen und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

GST-Fusionsprotein-Interaktionstest (*pull down*)

Proteininteraktionen wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen und *in vitro* translatierten Proteinen untersucht. Etwa 20 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurde an 40 µl Glutathion-Agarose (1:1 in PBS ohne Kalzium/Magnesium mit 1% Triton X-100) in einem Volumen von 200 µl (PBS mit 10% Glycerin, 1 mM DTT) für 30 min bei RT unter Rotieren gebunden. Im Falle einer Konkurrenz mit Thrombin-gespaltenem Protein wurde das GST-Fusionsprotein erst 1 h mit Überschuß (5-10 fach) an kompetitierendem Protein bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Agarose durch wiederholtes Zentrifugieren für 10 s bei 10.000 g zweimal mit kaltem PBS und einmal mit kaltem LBST-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,05% NP40, 1,5% Triton X-100) gewaschen. Die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Agarose wurde mit 10 µl des entsprechenden *in vitro* translatierten ³⁵S-markierten Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl LBST-Puffer mit 1 mM DTT und 1 mM PMSF gemischt. Unter Rotieren für 30 min bei RT und 30 min bei 4°C wurde eine Interaktion zwischen den beiden Proteinpartnern ermöglicht. Anschließend wurde die Glutathion-Agarose nochmals durch wiederholtes Zentrifugieren für 10 s bei 10.000 g viermal auf Eis mit kaltem LBST-Puffer

gewaschen. Die an das Glutathion gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zugabe von 25 µl 2xLaemmli-Probenpuffer (160 mM Tris, pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% Glycerin, 4% β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau), Mischen und Erhitzen für 10 min bei 95°C von der Glutathion-Agarose eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie.

4.22 Analyse des Kernimports von Proteinen (*nuclear import assay*, nach Adam et al. 1990 und Weis et al. 1995)

Produktion und Reinigung von (β-GAL)-*Histaq*-Fusionsproteinen

Für die Reinigung von *Histaq*-Fusionsproteinen macht man sich die hohe Affinität der Histidine zu Nickel zunutze. Die Fusion mit Beta-Galaktosidase (β-Gal) aus *E.coli* vergrößerte zum einen das Molekulargewicht des Fusionsproteins, damit dieses nicht passiv in den Kern diffundieren kann, zum zweiten diente es dazu, daß das Fusionsprotein durch Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen β-Gal nachgewiesen werden konnte. Die cDNA der zu exprimierenden Proteine wurde in einem speziellen Vektor an das 5'-Ende des β-Gal-Gens kloniert. Zur Expression der Plasmide wurde der *E. coli* Stamm BL21 verwendet, der mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert wurde.

Die Expression der Fusionsproteine wurde wie in 2.21 durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte wie in 2.21, die Fusionsproteine wurden anschließend mit Hilfe von Ni-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA) (QIAGEN) gebunden und mit 300 mM Imidazol (in PBS) als Kompetitor eluiert.

Der Nachweis und die Aufbewahrung der eluierten Fusionsproteine erfolgte wie oben beschrieben.

Permeabilisierung von HeLa Zellen (Weis et al., 1995)

Die Permeabilisierung von Zellen dient dem Zweck, daß zytosolische Faktoren, die beim Kerntransport mitwirken, verlorengehen und im Experiment, je nach Bedingungen, ersetzt werden können. Außerdem wird die Diffusion der rekombinanten Proteine, die im Experiment verwendet werden, erleichtert. Das schwache nichtionische Detergenz Digitonin (Fluka) permeabilisiert bevorzugt die Plasmamembran gegenüber inneren zellulären Membranen. Dies liegt am proportional höheren Cholesteringehalt der Plasmamembran, welches von Digitonin angegriffen wird.

Es wurden 5 große Flaschen HeLa Zellen bis 70% Konfluenz kultiviert, das Medium entfernt und mit PBS ohne Kalzium/Magnesium gewaschen. Die Zellen wurden mit je 5 ml *cell dissociation solution* (Sigma) oder 5 mM EDTA in PBS ohne Kalzium/Magnesium geerntet und

bei 500 g für 3 min zentrifugiert. Die Zellen des Sedimentes wurde in 50 mM Hepes-KOH (pH 7,3), 50 mM KAc, 8 mM MgCl₂, 2 mM EGTA resuspendiert und gezählt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Sediment in eiskaltem Puffer mit 50 µg/ml Digitonin (Fluka) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die permeabilisierten Zellen wurden zweimal mit demselben Puffer gewaschen, in Puffer mit 5% DMSO aufgenommen (1×10^7 Zellen/ml) und in Aliquots zu 200 µl bei -80°C eingefroren.

Präparation von Zellextrakten für *in vitro* nuclear import assay

Zur Herstellung eines zytoplasmatischen Extrakts aus HeLa Zellen wurden diese in der exponentiellen Wachstumsphase wie oben geerntet, in eiskaltem Puffer A (10 mM Hepes-KOH (pH 7,3), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension 10 mal mit einem *Dounce* Homogenisator B lysiert und 10 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für 1 h bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die zytoplasmatische Fraktion für mindestens 4 h bei 4°C gegen Transportpuffer TB (20 mM Hepes-KOH (pH 7,3), 110 mM KAc, 5mM NaAc, 2 mM MgAc, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) dialysiert und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Lysate von Kaninchenretikulozyten (*TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega)) wurden gegen Transportpuffer bei 4°C dialysiert und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Xenopus egg -Extrakte wurden von Karsten Weis bzw. Isabel Palacios (beide 1996/97; EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt und nach Adam et al. (1990) hergestellt.

***in vitro* Kernimportanalyse (*in vitro* nuclear import assay) und Proteindetektion**

Bei der *in vitro* Kernimportanalyse werden die zytoplasmadefizienten permeabilisierten Zellen mit rekombinantem Protein in einem geeigneten Puffer mit den hergestellten Zellextrakten und einem energieregenerierenden System inkubiert. Je nach Bedingungen konnte durch indirekte Immunfluoreszenz der Kerntransport mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Die Reaktion erfolgte in TB (20 mM Hepes-KOH (pH 7,3), 110 mM KAc, 5mM NaAc, 2 mM MgAc, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) mit 2mM ATP, 5 mM Kreatinphosphat (Sigma), 0,5 µg/ml Kreatinphosphokinase (Sigma), 8 µl *Xenopus egg*-Extrakt (oder HeLa-, oder Retikulozytenextrakt) und ca. 10^4 Digitonin-permeabilisierten HeLa Zellen (Adam et al. 1990) in einem Volumen von 12 µl, 30 min bei RT. Durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Transportpuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen durch Inkubation in 200 µl 7,4% Paraformaldehyd (PFA) in TB für 5-10 min fixiert. Die fixierten Zellen wurde durch ein 30% Saccharosekissen (in TB) auf ein mit poly-L-Lysin (Sigma) beschichtetes Glasplättchen

(*coverslip*) bei RT und 1000 g zentrifugiert. Das *coverslip* wurde herausgenommen und mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) 0,5% Tween-20 gewaschen.

Die Proteine wurden durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die *coverslips* wurden zuerst mit monoklonalem Maus-anti- β -gal Antikörper (Boehringer) 1: 400 in PBS für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 3x mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium), 0,5% Tween-20 gewaschen und für eine weitere Stunde mit FITC-markiertem anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Dianova) 1:50 in PBS inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde das *coverslip* mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger in einem Tropfen Einschlußmedium (*mounting medium*, Dako) plaziert und mit Nagellack (Avon) abgedichtet. Die Objekte wurden dann direkt im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) analysiert und fotografiert oder bei 4°C aufbewahrt.

4.23 Analyse des Kernimports von Proteinen durch Immunfluoreszenzfärbung

Präparation und Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung

Um den Androgenrezeptor mittels Immunfluoreszenzfärbung nachweisen zu können, werden große Proteinmengen benötigt. Deshalb wurden Cos-7 Zellen mit dem Wildtyp Androgenrezeptor und den kernimportdefekten Kernlokalisations-Signal (NLS)-Mutanten AR-R615H und AR-R617P, wie in 2.16 beschrieben, elektroporiert. Die Zellen wurden in 5 cm Petrischalen, in welche vorher Glasplättchen (*coverslips*) plaziert wurden, verteilt und 2 Tage in normalen DMEM 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen DMEM 3%CCS, 1% Penicillin/Streptomycin ausgetauscht und die Zellen für einen weiteren Tag inkubiert. Vier Stunden vor Fixierung wurden sie mit Hormon oder der entsprechenden Ethanolmenge behandelt.

Die Fixierung erfolgte nach Waschen mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) durch Inkubation mit 3% PFA f.c. für 15 min. Danach wurde das PFA abgesaugt und die Zellen mit 50 mM NH_4Cl für 15 min behandelt.

Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern

Die NH_4Cl -Lösung wurde abgesaugt und die *coverslips* 5 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS (ohne Kalzium/Magnesium) bedeckt. Danach wurde mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) gewaschen, die Zellen mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) 0,2% Gelatine für 20 min vorinkubiert und für 1 h mit dem AR-spezifischen Antikörper F 39.4.1 (BioGenex) 1:10 in PBS (ohne Kalzium/Magnesium) 0,2% Gelatine bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS (ohne Kalzium/Magnesium) für je 5 min wurde der monoklonale TRITC-markierte

Sekundärantikörper Anti-Maus-TRITC aus der Ziege (Dianova) 1: 50 in PBS (ohne Kalzium/Magnesium) 0,2% Gelatine für 1 h appliziert. Für die Kernfärbung wurden die Proben vor den letzten 3 Waschschrinen 5 min mit 1:1000 in PBS (ohne Kalzium/Magnesium) verdünntem Bis-Benzimid (Hoechst Nr.33250, Sigma) inkubiert und weiter wie in 2.22 verfahren.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMV	<i>avian myoblastosis virus</i>
AP-1	Aktivator-Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
ARA70	Androgenrezeptor-assoziiertes Protein ($M_g = 70$ kDa)
ARE	<i>androgen response element</i>
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
B_{max}	maximale spezifische Bindung
BSA	Rinderserumalbumin
CAIS	Komplette Androgeninsensitivität (<i>complete androgen insensitivity</i>)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB-Bindeprotein
CCS	mit Aktivkohle behandeltes FCS (<i>charcoal stripped calf serum</i>)
cDNA	zur RNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
Cyp17	Maus P450 17 α -Hydroxylase/C17-20 Lyasegen
dATP	2`-Deoxyadenosintriphosphat (analog: dCTP, dGTP, dTTP)
ddATP	2`,3`-Dideoxyadenosintriphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DBD	DNA-Bindedomäne
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion

E ₂₆₀ , E ₂₈₀	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Amino-ethylether) -Tetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ERM et al.	Ets verwandtes Molekül (<i>Ets related molecule</i>) und andere (lat. et alii)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
fMol	Femtomol
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
g	relative Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	glucocorticoid response element
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
hAR	menschlicher Androgenrezeptor
HBD	Hormon-Bindedomäne
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRE	<i>hormone response element</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i>
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen (1000 Basen)
KD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LBD	Liganden-bindende Domäne
LH	luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteotropin-freisetzendes Hormon/ Luteotropin-Releasing Hormon
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molar
mA	Milliampere

MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MBq	Megabequerel
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	Boten-RNA
Na-Acetat	Natriumacetat
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
nM	nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PKC	Proteinkinase C
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rNTP's	Ribonukleosidtriphosphate
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur
SBMA	spinale und bulbäre Muskelatrophie

SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
SSC	<i>standard saline citrate</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAF	Transaktivierungsfunktion
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIFII	transcriptional mediator/intermediary factor 2
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TR	Tyroidhormonrezeptor
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheiten (Units)
u. a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VDR	Vitamin D-Rezeptor
wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Ein und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

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

Literatur

- Aarnisalo, P., Palvimo, J. J., and Janne, O. A. (1998): CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2122-2127.
- Adam, S. A., and Gerace, L. (1991): Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* **66**, 837-847.
- Adam, S. A., Sterne-Marr, R. E., and And Gerace, L. (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* **111**, 807-816.
- Amrhein, J. A., Klingensmith, G. J., Walsh, P. C., McKusick, V. A., and Migeon, C. J. (1977): Partial androgen insensitivity: The reifenstein syndrome revisited. *N. Engl. J. Med.* **297**, 350-356.
- Bangsboll, S., Qvist, I., Lebech, P. E., and Lewinsky, M. (1992): Testicular feminization syndrome and associated gonadal tumors in Denmark. *Acta Obstet Gynecol Scand* **71**, 63-66.
- Barberis, A., Superti-Furga, G. and Busslinger, M. (1987) Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promotor. *Cell*, **50**, 347-359.
- Baulieu, E.-E. (1990) In E.-E. Baulieu and P. A. Kelly (eds.), *Hormones, a complex communications network*, Hermann, publishers in arts and science, Chapman and Hall, New York and London, Vol. 1, pp. 3-169.
- Beato, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344.
- Beato, M. (1993) In M. Karin (ed.) *Gene regulation by steroid hormones*, Birkhäuser, Boston, Vol. 1, pp. 43-75.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, **19**, 327-336.
- Beitel, L., Prior, L., Vasiliou, D., Gottlieb, B., Kaufman, M., Lumbroso, R., Alvarado, C., McGillivray, B., Trifiro, M. und Pinsky, L. (1994). Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable a-helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor. *Hum Mol Genet* **3**: 21-27.

- Brinkmann, A. O., Jenster, G., Ris-Stalpers, C., van der Korput, H. A. G. M., Brüggewirth, H., Boehmer, A., and Trapman, J. (1996): Molecular basis of androgen insensitivity. *Steroids* **61**, 172-175.
- Brinkmann, A. O., Jenster, G., Ris-Stalpers, C., van der Korput, J. A. G. M., Brüggewirth, H., Boehmer, A., and Trapman, J. (1995): Androgen receptor mutations. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **53**, 443-448.
- Brown, T. R., Scherer, P. A., Chang, Y.-T., Migeon, C. J., Ghirri, P., Murolo, K., and Zhou, Z. (1993): Molecular genetics of human androgen insensitivity. *Eur. J. Pediatr.* **152**, 62-69.
- Bulfield, G., and Nahum, A. (1978): Effect of the mouse mutants testicular feminization and sex reversal on hormone-mediated induction and repression of enzymes. *Biochem. Genet.* **16** (7-8), 743-750.
- Burgos-Trinidad, M., Youngblood, G. L., Maroto, M. R., Scheller, A., Robins, D. M., and Payne, A. H. (1997): Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Mol Endocrinol* **11**, 87-96.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J., and Munoz, A. (1997): Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* **15**, 3351-3364.
- Cato, A. C. B., and Weinmann, J. (1988): Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells. *J Cell Biol* **106**, 2119-2125.
- Cato, A. C. B., Henderson, D., and Ponta, H. (1987): The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* **6**, 363-368.
- Chamberlain, N. L., Whitacre, D. C., and Miesfeld, R. L. (1996): Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J Biol Chem* **271**, 26772-26778.
- Chang, C., Kokontis, J., and Liao, S. (1988): Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7211-7215.
- Charest, N. J., Zhou, Z. X., Lubahn, D. B., Olsen, K. L., Wilson, E. M., and French, F. S. (1991): A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol Endocrinol* **5**, 573-581.
- Chen, C. Y., You, Y., and Shyu, A. B. (1992): Two cellular proteins bind specifically to a purine-rich sequence necessary for the destabilization function of a c-fos protein-coding region determinant of mRNA instability. *Mol Cell Biol* **12**, 5748-5757.

- Choong, C. S., Kempainen, J. A., Zhou, Z. X. and Wilson, E. M. (1996b) Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol*, **10**, 1527-1535.
- Choong, C. S., Quigley, C. A., French, F. S., and Wilson, E. M. (1996): A novel missense mutation in the amino-terminal domain of the human androgen receptor gene in a family with partial androgen insensitivity syndrome causes reduced efficiency of protein translation. *J Clin Invest* **98**, 1423-1431.
- Choong, C. S., Sturm, M. J., Strophair, J. A., McCulloch, R. K., Tilley, W. D., Leedman, P. J. and Hurley, D. M. (1996a) Partial androgen insensitivity caused by an androgen receptor mutation at amino acid 907 (Gly-->Arg) that results in decreased ligand binding affinity and reduced androgen receptor messenger ribonucleic acid levels. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 236-243.
- Claessens, F., Alen, P., Devos, A., Peeters, B., Verhoeven, G., and Rombauts, W. (1996): The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* **271**, 19013-19016.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.-A., and Carlstedt-Duke, J. (1991): Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* **266**, 3107-3112.
- de Wet, J., Wood, K., DeLuca, M., Helinski, D., and Subramani, S. (1987): Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**, 725-737.
- Decker, C. J., and Parker, R. (1994): Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **19**, 336-340.
- Dworetzky, S. I., and Feldherr, C. M. (1988): Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **106**, 575-584.
- Eberle, J., and Klocker, H. (1993): Der Androgenrezeptor. *Urologe (A)* **32**, 460-465.
- Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., and Kawashima, H. (1997): Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **9**, 99-102.
- Eriksson, P. and Wrangé, O. (1990) Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. **265**, 3535-3542.
- 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.
- Forman, B. M., and Samuels, H. H. (1990): Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1293-1301.
- Freedman, L. P. (1992): Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* **13**, 129-145.

- Fuhrmann, U., Parczyk, K., Klotzbücher, M., Klocker, H., and Cato, A. C. B. (1998, im Druck): Recent developments in molecular action of antihormones. *J Mol Med.*
- Gast, A., Neuschmid-Kaspar, F., Klocker, H. and Cato, A. C. B.: A single amino acid exchange abolishes dimerization of the androgen receptor and causes Reifenstein syndrome. *Mol Cell. Endocrinol.* **111** (1995) 93-98.
- Gast, A., Schneikert, J., and Cato, A. C. B. (1998, im Druck): N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*
- Gerber, H. P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1994): Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-811.
- Görlich, D., and Mattaj, I. (1996): Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**, 1513-1518.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A., and Hartmann, E. (1996a): A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15**, 1810-1817.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E., and 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., and Bischoff, F. (1996b): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15**, 5584-5594.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R., and Hartmann, E. (1994): Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**, 767-778.
- Gottlieb, B., Lehvaslaiho, H., Beitel, L., Lumbroso, R., Pinsky, L., and Trifiro, M. (1998): The Androgen Receptor Gene Mutations Database. *Nucleic Acids Res* **26**, 234-238.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456-467.
- Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B., and Zingg, H. (1998): Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* **392**, 509-512.
- Green, S., Issemann, I. and Sheer, E. (1988) A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 369.
- Griffin, J. E., and Wilson, J. D. (1989): The androgen resistance syndromes: 5 α -reductase deficiency, testicular feminization, and related disorders, pp. 1919-1944. In C. R. Scriver, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Ed.): *The metabolic basis of inherited disease*, McGraw-Hill, New York.

- Grino, P. B., Griffin, J. E., and Wilson, J. D. (1990): Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinol.* **126**, 1165-1172.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1989): Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* **57**, 1147-1154.
- Hanahan, B. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1986): Techniques for the transformation of *E. coli*. DNA cloning, pp. 109-135. In D. M. Glover (Ed.), IRL Press, Oxford.
- Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J.-A., and Kaptein, R. (1990): Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **2**, 157-160.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P. and Cato, A. C. B. (1997) I-kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoidreceptor. *EMBO J* **16**, 4698-4707.
- Heckert, L. L., Wilson, E. M., and Nilson, J. H. (1997): Transcriptional repression of the alpha-subunit gene by androgen receptor occurs independently of DNA binding but requires the DNA-binding and ligand-bindinghormone-mediated induction and repression of enzymes. *Biochem Genet* **16**, 743-750.
- Howe, L., Itho, T., Katagiri, C. und Ausio, J. (1998). The histone binding protein nucleoplamin does not facilitate binding of transcription factor IIIA to nucleosomal *Xenopus laevis* 5S rRNA genes. *Biochemistry* **37**: 1174-1177.
- Jenster, G., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1993): Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* **293**, 761-768.
- Jenster, G., van der Korput, H. A. G. M., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1992): Functional domains of the human androgen receptor. *J Steroi Biochem Molec Biol* **41**, 671-675.
- Jenster, G., van der Korput, H. A. G. M., van Vroonhoven, C., van der Kwast, T. H., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1991): Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1396-1404.
- Jewell, C. M., Webster, J. C., Burnstein, K. L., Sar, M., Bodwell, J. E., and Cidlowski, J. A. (1995): Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**, 135-146.

- Jost, A. (1990): Hormonal control of the masculinization of the body, pp. 439-442. In E.-E. Baulieu, and P. A. Kelly (Eds): *Hormones, from molecules to disease*, Hermann, publishers in arts and science, Chapman and Hall, New York and London.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kallio, P. J., Poukka, H, Eumel, H. B., Moilanen, A., Jänne, O. A. and Palvimo, J. J. (1995) Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 1017-1028.
- Kaspar, F. (1992): Androgenrezeptordefekt bei fünf Patienten aus zwei Familien mit Reifenstein-Syndrom. Identifizierung und Charakterisierung einer Punktmutation, Leopold-Franzens-Universität, Innsbruck, Österreich.
- Kaspar, F., Klocker, H., Denninger, A., and Cato, A. C. B. (1993): A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: Identification of the function of a conserved alanine residue in the D box of steroid receptors. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7850-7858.
- Keller, E. T., Chang, C., and Ershler, W. B. (1996): Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of IkappaB α levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *J Biol Chem* **271**, 26267-26275.
- Kempainen, J. A., Lane, M. V., Sar, M. and Wilson, E. M. (1992) Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, **267**, 968-974.
- Knippers, R. (1995): *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag.
- Koepp, D. M., and Silver, P. A. (1996): A GTPase controlling nuclear trafficking: running the right way or walking RANdomly? *Cell* **87**, 1-4.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* **108**: 229-241.
- Kuiper, G. G. J. M., Faber, P. W., van Rooij, H. C. J., van der Korput, J. A. G. M., Ris-Stalpers, C., Klaassen, P., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1989): Structural organization of the human androgen receptor gene. *J. Mol. Endocr.* **2**, R1-R4.
- Kuiper, G. G.J. M., de Rooter, P.E., Trapman, J, Jenster, G, Brinkmann, A.O. (1993) In vitro translation of androgen receptor cRNA results in an activated androgen receptor protein. *Biochem J*, **15**, 161-167.
- Kupfer, S. R., Marschke, K. B., Wilson, E. M., and French, F. S. (1993): Receptor accessory factor enhances specific DNA binding of androgen and glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 17519-17527.

- Kupfer, S. R., Wilson, E. M., and French, F. S. (1994): Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 20622-20628.
- La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., and Fischbeck, K. H. (1991): Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* **352**, 77-79.
- Laemmli, U. D. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-684.
- Lindzey, J., Kumar, M. V., Grossman, M., Young, C., and Tindall, D. J. (1994): Molecular mechanism of androgen action. *Vitam Horm* **49**, 383-432.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Sullivan, P. M., Willard, H. F., French, F. S., and Wilson, E. M. (1988): Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**, 327-330.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991): Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497-505.
- Maclean, H., Warne, G., and Zajac, J. (1995): Defects of androgen receptor function: from sex reversal to motor neurone disease. *Mol Cell Endocrinol* **112**, 133-141.
- Mangelsdorf, D., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.
- Marcelli, M., Tilley, W. D., Wilson, C. M., Griffin, J. E., Wilson, J. D., and McPhaul, M. J. (1990): Definition of the human androgen receptor gene structure permits the identification of mutations that cause androgen resistance: premature termination of the receptor protein at amino acid residue 588 causes complete androgen resistance. *Mol Endocrinol* **4**, 1105-1116.
- Marcelli, M., Zoppi, S., Grino, P. B., Griffin, J. E., Wilson, J. D., and McPhaul, M. J. (1991): A mutation in the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete testicular feminization in a patient with receptor-positive androgen resistance. *J. Clin. Invest.* **87**, 1123-1126.
- Marcinkowska, E., Wiedlocha, A., and Radzikowski, C. (1997): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induced activation and subsequent nuclear translocation of MAPK is upstream regulated by PKC in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **18**, 419-426.
- McEwan, I. J., and Gustafsson, J. (1997): Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8485-8490

- McPhaul, M. J., Marcelli, M., Tilly, W., Griffin, J. E., and Wilson, J. D. (1991): Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene. *FASEB J.* **5**, 2910-2915.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., and Gerace, L. (1993): Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* **123**, 1649-1659.
- Migeon, B. R., Brown, T. R., Axelman, J., and 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.* **78**, 6339-6343.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996): Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15**, 1292-1300.
- Moore, M. S., and Blobel, G. (1993): The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-663.
- Moore, M. S., and Blobel, G. (1994): Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10212-10216.
- Moore, M., and Blobel, G. (1992): The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* **69**, 939-950.
- Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1996): The binding site of karyopherin α for karyopherin β overlaps with a nuclear localization sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6572-6576.
- Morris, J. M. (1953): The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *Amer. J. Obst. Gynec.* **65**, 1192-1211.
- Mowszowicz, I., Lee, H.-J., Chen, H.-T., Mestayer, C., Portois, M.-C., Cabrol, S., Mauvais-Jarvis, P., and Chang, C. (1993): A point mutation in the second zinc finger of the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in two siblings with receptor-positive androgen resistance. *Mol Endocrinol* **7**, 861-869.
- Nebl, G., and Cato, A. C. B. (1995): NFI/X proteins: a class of NFI family of transcription factors with positive and negative regulatory domains. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 85-95
- Newmeyer, D., and Forbes, D. (1988): Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* **11**, 641-653.
- Paine, P. L., Moore, L. C., and Horowitz, S. B. (1975): Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-114.
- Palacios, I., Herzer, M., Adam, S., and Mattaj, I. (1997): Nuclear import of U snRNPs requires importin β . *EMBO J* **16**, 6783-6792.

- Palvimo, J. J., Reinikainen, P., Ikonen, T., Kallio, P. J., Moilanen, A., and Janne, O. A. (1996): Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* **271**, 24151-24156.
- Patterson, M. N., McPhaul, M. J., and Hughes, I. A. (1994): Androgen insensitivity syndrome. *Bailliere's clin. endocrinol. metabol.* **8**, 379-404.
- Pennisi, E. (1998). The nucleus's revolving door. *Science* **279**: 1129-1131.
- Picard, D. (1998): Steroids tickle cells inside and out. *NATURE* **392**, 437-438.
- Picard, D., and Yamamoto, K. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* **6**, 3333-3340.
- Pinsky, L., Trifiro, M., Kaufman, M., Beitel, L., Mhatre, A., Kazemi-Esfarjani, P., Sabbaghian, N., Lumbroso, R., Alvarado, C., Vasiliou, M., and Gottlieb, B. (1992): Androgen resistance due to mutation of the androgen receptor. *Clin Invest Med* **15**, 456-472.
- Pollard, V., Michael, W., Nakielny, S., Siomi, M., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1996): A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-994.
- Powers, M., and Forbes, D. (1994): Cytosolic factors in nuclear transport: what's importin? *Cell* **79**, 931-934.
- Pratt, W. B. (1993): The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **268**, 21455-21458.
- Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., El-Awady, M. K., Wilson, E. M., and French, F. S. (1995): Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* **16**, 271-321.
- Reifenstein, E. C. (1947): Hereditary familial hypogonadism. *Proc. Am. Fed. Clin. Res.* **3**, 86-99.
- Reinboth, R. (1980): *Vergleichende Endokrinologie*, pp. 437, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995): Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-689.
- Rexach, M., and Blobel, G. (1995): Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**, 683-692.
- Richardson, W., Mills, A., Dilworth, S., Laskey, R., and Dingwall, C. (1988): Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell* **11**, 655-664.
- Ris-Stalpers, C., Hoogenboezem, T., Sleddens, H., Verleun-Mooijman, M., Degenhart, H., Drop, S., Halley, D., Oosterwijk, J., Hodgins, M., Trapman, J., and Brinkmann, A. O.

- (1994): A practical approach to the detection of androgen receptor gene mutations and pedigree analysis in families with X-linked androgen insensitivity. *Pediatr Res* **36**, 227-234.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and 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.
- Rosenblum, J. S., Pemberton, L. F., and Blobel, G. (1997): A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation. *J Cell Biol* **139**, 1655-1661.
- Rout, M. p., Blobel, G., and Aitchison, J. D. (1997): A distinct nuclear pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**, 715-725.
- Sachs, A. B. (1993): Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* **74**, 413-421.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Sato, N., Sadar, M. D., Bruchofsky, N., Saatcioglu, F., Rennie, P. S., Sato, S., Lange, P. H., and Gleave, M. E. (1997): Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Biol Chem* **272**, 17485-17494.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P-A., Klocker, H., de Launoit, Y. and 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.
- Schreiber , E., Matthias, P., Müller, M. M. and W., S. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. **17(15)**, 6419.
- Silver, P. A. (1991): How proteins enter the nucleus. *Cell* **64**, 489-497.
- Simental, J. A., Sar, M., Lane, M. V., French, F. S., and Wilson, E. M. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 510-518.
- Simos, G., and Hurt, E. C. (1995): Nucleocytoplasmic transport: factors and mechanisms. *FEBS letters* **369**, 107-112.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **1990**, **346**, 240-244.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.

- Smith, D. F., and Toft, D. O. (1993): Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* **7**, 4-11.
- Sone, T., Marx, S. J., A., L. U. and Pike, J. W. (1990) A unique point mutation in the human vitamin D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* **4**, 623-631.
- Steglehner (1817): De hermaphroditorum natura. *Arch. Gyn* **8**, 487. (zitiert von Leopold, Vortrag der geburtshülflichen Gesellschaft in Leipzig, 1875)
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Tilley, W. D., Marcelli, M., Wilson, J. D., and McPhaul, M. J. (1989): Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 327-331.
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G. G. J. M., van der Korput, J. A. G. M., Faber, P. W., van Rooij, H. C. J., Geurts van Kessel, A., Voorhorst, M. M., Mulder, E., and Brinkmann, A. O. (1988): Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **153**, 241-248.
- Truant, R., Fridell, R., Benson, R., Bogerd, H., and Cullen, B. (1998): Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2
- Truss, M., and Beato, M. (1993): Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* **14**, 459-479.
- van Laar, J. H., Voorhorst-Ogink, M. M., Zegers, N. D., Boersma, W. J. A., Claassen, E., van der Korput, J. A. G. M., Ruizeveld de Winter, J. A., van der Kwast, T. H., Mulder, E., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1989): Characterization of polyclonal antibodies against the N-terminal domain of the human androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **67**, 29-38.
- Vasiliou, D., Trifiro, M., and Pinsky, L. (1994): Mutations in the N-terminal domain of the human androgen receptor associated with androgen resistance syndromes. Program of the 76th Annual meeting of the endocrine society, Anaheim, CA, pp. 495.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Brinkmann, A. O., Grootegoed, J. A., and Mulder, E. (1992a): Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry* **31**, 2393-2399.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Zegers, N. D., van der Kwast, T. H., Grootegoed, J. A., and Mulder, E. (1992b): 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.

- Vermeulen, A., and Verdonck, G. (1992): Representativeness of a single point plasma testosterone level for the long term hormonal milieu in men. *J Clin Endocrinol Metab* **74**, 939-942.
- Weis, K., Dingwall, C. und Lamond, A. (1996b). Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *EMBO J.* **15**: 7120-7128.
- Weis, K., Mattaj, I. und Lamond, A. (1995). Identification of hSRP1a as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* **268**: 1049-1053.
- Weis, K., Ryder, U. und Lamond, A. (1996a). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 α is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* **15**: 1818-1825.
- Wiener, J. S., Teague, J. L., Roth, D. R., Gonzales Jr., E. T., and Lamb, D. J. (1997): Molecular biology and function of the androgen receptor in genital development. *J. Urology* **157**, 1377-1386.
- Wong, C. I., Zhou, Z. X., Sar, M., and Wilson, E. M. (1993): Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem* **268**, 19004-19012.
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996): A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* **3**, 206.
- Yeh, S., and Chang, C. (1996): Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5517-5521.
- Ylikomi, T., Bocquel, M. T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992): Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* **11**, 3681-3694.
- Zhang, M., Magit, D., and Sager, R. (1997): Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5673-5678.
- Zhou, Z. X., Lane M, V., Kempainen J, A., French F, S., and Wilson E, M. (1995): Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* **9** 208-218.
- Zhou, Z., X., Sar, M., Simental, J., Lane, M., and 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.

Zoppi, S., Marcelli, M., Deslypere, J.-P., Griffin, J. E., Wilson, J. D., and McPhaul, M. J. (1992): Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. *Mol. Endocrinol.* **6**, 409-415.