

---

Genetisches Institut  
Fachbereich 08 (Fachrichtung Biologie)  
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Neue Strategien in der Prostatakrebstherapie:  
Die Generierung eines neuartigen,  
Androgenrezeptor-spezifischen Corepressors  
(T-Pep 524)**

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Christina Reeb  
März 2007

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner  
1. Gutachter: Prof. Dr. Aria Baniahmad  
2. Gutachter: Prof. Dr. Ewald Beck

---

## Publikationen

- Moehren, U., Dressel, U., **Reeb, C.A.**, Väisänen, S., Dunlop, T. W., Carlberg, C., and Baniahmad, A.. The highly conserved region of the corepressor Sin3A functionally interacts with the corepressor Alien. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jun 01;32(10):2995-3004.
- Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Asim, M., Dotzlaw, H., and Baniahmad A.. Co-activator and co-repressor interplay on the human androgen receptor. *Andrologia.* 2005 Dec;37(6):211-2.
- Moehren, U., Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Hong, W., and Baniahmad, A.. Alien interacts with the human androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Mol Endocrinol.* 2007 (im Druck)
- Moehren, U., Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Grasseli, A., Farsetti, A., and Baniahmad, A.. Androgen-dependent repression of the human telomerase in the prostate but lack of repression in prostate cancer. (eingereicht)
- Tenbaum, S.P., Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Goeman, F., Escher, N., Kob, R., von Eggeling, F., Melle, C., and Baniahmad, A.. Alien inhibits E2F1 gene expression and cell proliferation. (eingereicht)
- **Reeb, C.A.**, Ceraline, J., and Baniahmad, A.. The newly generated AR-specific corepressor (T-Pep 524) represses androgen receptor transactivation activity and inhibits growth of LNCaP prostate cancer cells. (in Vorbereitung)

## Präsentationen

- Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Moehren, U., Baniahmad, A. The Molecular Mechanisms of the Corepressor Alien in Prostate Cancer Therapy High-Level-Scientific-Conference: Hormones and the Genome: Basic research towards improvement of diagnostic and therapeutic medicine, Günzburg/Ulm, 29.4.2004 - 1.5.2004
- **Reeb, C.A.** und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers Schering Fellow`s Meeting, Berlin, Germany, 22.6.2005 – 24.6.2005

## Poster-Präsentationen

- Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Moehren, U., Baniahmad, A. The Molecular Mechanisms of the Corepressor Alien in Prostate Cancer Therapy High-Level-Scientific-Conference: Hormones and the Genome: Basic research towards improvement of diagnostic and therapeutic medicine, Günzburg/Ulm, 29.4.2004 - 1.5.2004
- Papaioannou, M., **Reeb, C.A.**, Moehren, U., Baniahmad, A. The Molecular Mechanisms of the Corepressor Alien in Prostate Cancer Therapy Androgens 2004: Symposium on Androgen receptor function, Berlin, 7.10. - 8.10.2004
- **Reeb, C.A.** und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers Schering Fellow`s Meeting, Berlin, Germany, 22.6.2005 – 24.6.2005

- 
- **Reeb, C.A.** und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers  
EMBO conference: Nuclear receptors: From Chromatin to Disease, Gardone Riviera, Lake Garda, Italy 29.9.2005 - 1.10.2005
  - **Reeb, C.A.** und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors (CoR) and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers  
17th annual meeting of the German Society of Human genetics, Heidelberg, Germany, 8.3.2006 - 11.3.2006
  - **Reeb, C.A.**, Ceraline, J., und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors (CoR) and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers  
12<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Athens, Greece, 12.9.2006 - 18.9.2006
  - **Reeb, C.A.**, Ceraline, J., und Baniahmad, A. Repression of Human Androgen Receptor (AR) by Corepressors (CoR) and New Strategies of AR Inhibition in Prostate Cancer Using Peptide Aptamers  
Androgens 2006, Cambridge, Great Britain, 25.9.2006 - 27.9.2006

## **Stipendium**

Doktorandenstipendium der Scheringstiftung

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	2
2.1	Der Prostatakrebs und seine hormonelle Therapie .....	2
2.1.1	Der Androgen-unabhängige Prostatakrebs.....	3
2.2	Der Androgenrezeptor.....	4
2.3	Corepressoren .....	7
2.3.1	SMRT und NCoR.....	8
2.3.2	Alien.....	8
2.4	Die Peptidaptamere .....	10
2.4.1	Die Peptidtherapie .....	11
2.5	Zielsetzung der Arbeit .....	13
2.6	Arbeitsstrategie zur Generierung des neuen Corepressors .....	14
3	Material und Methoden .....	15
3.1	Geräte .....	15
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	16
3.3	Chemikalien und fertig zum Gebrauch erhältliche Baukästen ("Kits").....	16
3.4	Oligonukleotide und Enzyme .....	18
3.5	Verwendete Oligonukleotidsequenzen .....	19
3.6	Arbeitsvorbereitungen .....	19
3.7	Arbeiten mit Bakterienkulturen.....	19
3.7.1	Bakterienstämme.....	19
3.7.2	Wachstum und Lagerung von Bakterien .....	20
3.7.3	Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien.....	21
3.7.4	Transformation von Bakterien .....	22
3.8	Arbeiten mit Nukleinsäuren (DNA und RNA) .....	22
3.8.1	Lagerung .....	22
3.8.2	Schnellpräparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp) .....	22
3.8.3	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp).....	23
3.8.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen .....	26
3.8.5	Restriktionsverdau.....	27
3.8.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
3.8.7	Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	28
3.8.8	Auffüllen von 5' DNA-Enden .....	28
3.8.9	Ligation von DNA Fragmenten .....	28
3.8.10	Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen .....	29
3.8.11	cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	30
3.8.12	Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR .....	31
3.8.13	Die quantitative <i>Real-Time</i> PCR .....	31
3.9	Arbeiten mit Hefekulturen.....	33
3.9.1	Hefestämme .....	33
3.9.2	Wachstum und Lagerung der Hefestämme .....	33
3.9.3	Die Hefetransformation .....	33
3.10	Eukaryotische Zellkulturen .....	36
3.10.1	Verwendete Zelllinien .....	36
3.10.2	Lagerung und Auftauen eukaryotischer Zellen .....	36
3.10.3	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien .....	36
3.10.4	Herstellung von Aktivkohle-behandeltem FCS.....	37
3.10.5	DNA-Transfer in eukaryotische Zellen .....	38
3.10.6	Der Luziferase-Aktivitätstest.....	39
3.10.7	Der LacZ-Test.....	40
3.10.8	Der <i>Colony Formation Assay</i> .....	41
3.10.9	Wachstumskurven .....	41
3.11	Zur Verfügung gestellte Plasmide.....	42
4	Ergebnisse .....	43
4.1	Die Rolle von Corepressoren in der Antihormontherapie .....	43
4.1.1	Antihormone hemmen das Wachstum der humanen Prostatakrebszelllinie LNCaP ..	43
4.1.2	Die Corepressoren Alien□ und SMRT hemmen das Wachstum der Prostatakrebszelllinie LNCaP .....	46

4.2	Charakterisierung der minimalen Interaktionsdomänen von SMRT für die Interaktion mit Kernhormonrezeptoren .....	51
4.2.1	Die Deletion SCoRNR1+2 interagiert mit dem Thyroidhormonrezeptor .....	54
4.2.2	Die Deletionen SMRT-ID1 und SCoRNR1+2 interagieren mit dem Retinsäurerezeptor 56	
4.2.3	Der vollständige C-Terminus von SMRT wird für die Interaktion mit dem Androgenrezeptor benötigt .....	58
4.3	Die Generierung eines neuartigen Corepressors .....	59
4.3.1	Die Identifizierung eines potenten Bindemotivs für den Androgenrezeptor .....	60
4.3.2	Die Identifizierung einer potenten Repressionsdomäne für den neuen Corepressor .	79
4.3.3	Der neue Corepressor (T-Pep 524) hemmt das Wachstum von Prostatakrebszellen	83
5	Diskussion.....	88
5.1	Corepressoren sind an der Hemmung des Wachstums von Prostatakrebszellen in der Antihormontherapie beteiligt .....	88
5.2	Minimale Bindemotive .....	89
5.3	T-Pep 524 ist ein neuer spezifischer CoR für den AR .....	92
5.4	Die Möglichkeiten der Peptidtherapie .....	93
5.5	Ausblick .....	96
6	Literaturverzeichnis.....	98
7	Anhang.....	110
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	110
7.2	Plasmidkarten der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide .....	113

# 1 Zusammenfassung

Der Prostatakrebs ist die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern in der westlichen Welt. Hierbei ist das Wachstum des Prostatatumors zunächst Androgen-abhängig. Die Wirkung der Androgene wird durch den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Somit ist der aktivierte AR einer der essentiellen Faktoren für das Wachstum des Prostatakarzinoms und daher ein zentrales *Drug Target* in der Prostatakrebstherapie. Bisher finden zwei hormonelle medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten Anwendung in der Prostatakrebstherapie. Hierbei handelt es sich zum Einen um die Hemmung der testikulären Androgenproduktion durch die Gabe von LHRH (*Luteinizing Hormone-releasing Hormone*)-Analoga, zum Anderen finden sog. Antihormone Anwendung. Diese beiden Therapien werden in Kombination eingesetzt. Der Schwachpunkt dieser nicht-invasiven Therapie ist, dass nach ca. 12-24 Monaten fast alle Prostatakarzinome Androgen-unabhängig werden und unbeeinträchtigt durch die bestehende Behandlung weiter wachsen. Obwohl das Wachstum in dieser Phase Hormon-unabhängig ist, ist es dennoch abhängig von der Aktivität des Rezeptors. Das Hormon-unabhängige Wachstum wird durch verschiedene Mechanismen begünstigt. Dazu gehören im Besonderen die Amplifikation des AR-Gens und ein Ungleichgewicht der AR-regulierenden Cofaktoren zu Gunsten der AR-aktivierenden Coaktivatoren (CoA). Der AR ist trotz des Hormon-unabhängigen Wachstums noch das *Drug Target* für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten. Daher wurde in dieser Arbeit an einer neuen Strategie zur Hemmung der AR-Aktivität geforscht.

In der Gegenwart der bekannten Antihormone vermitteln sog. Corepressoren (CoR) durch die Interaktion mit dem AR die Hemmung der AR-vermittelten Transaktivierung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CoRen Alien und SMRT eine wesentliche Rolle in der Repression des Wachstums von Prostatakrebszellen in der Gegenwart des Antihormons Cyproteroneacetat (CPA) spielen. Basierend auf diesem Ergebnis wurde nach AR-spezifischen Bindemotiven gesucht, welche fusioniert an die starke Repressionsfunktion von SUMO, neuartige AR-spezifische CoRen bilden können. Diese könnten bei einem potenziellen Einsatz in der Prostatakrebstherapie die größeren Mengen an AR hemmen, das Gleichgewicht der Cofaktoren wieder in Richtung der hemmenden CoRen regulieren und dadurch dem Hormon-unabhängigem Wachstum entgegenwirken. Daher wurden hier in einem Peptidaptamer-Screen in Hefen neue, kurze Peptide gefunden, die mit dem humanen AR interagieren. Diese AR-spezifische Interaktion wurde im modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System in Säugerzellen (darunter die Prostatakrebszelllinie LNCaP) für den Wildtyp-AR und für die in LNCaP-Zellen exprimierte mutierte Variante AR<sub>T877A</sub> bestätigt. Durch die Fusion eines mit dem AR-interagierenden Peptidaptamers an den Repressor SUMO entstand der neue CoR T-Pep 524 (therapeutisches Peptid 524). Für T-Pep 524 konnte weiterhin funktionell gezeigt werden, dass die Transaktivierung des ARs gehemmt wird. Zudem reprimiert T-Pep 524 das Wachstum von LNCaP-Zellen sowie die Expression des AR-Zielgens PSA. T-Pep 524 scheint also einen neuartigen AR-spezifischen CoR darzustellen, der in potenziellen neuen Therapiestrategien Anwendung finden könnte.

## 2 Einleitung

Der Prostatakrebs ist das am häufigsten diagnostizierte Malignom und die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache bei Männern in der westlichen Welt (Bray et al., 2002; Brinkmann and Trapman, 2000). Die Wahrscheinlichkeit an Prostatakrebs zu erkranken steigt mit dem Alter (Chatterjee, 2003). In Deutschland werden jährlich ca. 40.000 Neuerkrankungen diagnostiziert (Schätzung des Robert Koch Instituts). Als wichtiger diagnostischer Marker gilt die Menge des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut. Hier wird eine Menge von 4 ng/ml PSA als Grenzwert angesehen (Catalona et al., 1991; Diamandis, 1998). Weil das Prostatakarzinom in den anfänglichen Stadien Hormon-abhängig wächst, gibt es gute Möglichkeiten das Wachstum zu hemmen. Da es jedoch im Krankheitsverlauf zu immer weiteren Veränderungen kommen kann, die ein Therapie-unabhängiges Wachstum fördern ist die Suche nach neuen Behandlungsstrategien sehr wichtig. Im Folgenden werden die bereits bestehenden Therapiemöglichkeiten dargestellt.

### **2.1 Der Prostatakrebs und seine hormonelle Therapie**

Der lokal auf die Prostatakapsel beschränkte Tumor kann durch einen chirurgischen Eingriff, die Prostatectomie, entfernt oder durch eine lokale Strahlentherapie reduziert werden. Die Proliferation des Prostatatumors, ist ebenso wie gesundes Prostatagewebe anfänglich Androgen-abhängig (Feldman and Feldman, 2001; Roy et al., 1999). Daher ist die primäre Therapie des Prostatakarzinoms entweder die medikamentöse Hemmung der testikulären Androgenproduktion durch LHRH (*Luteinizing Hormone-releasing Hormone*)-Analoga oder die operative Kastration (Corbin, 1982; Fuhrmann et al., 1998). Beide Ansätze führen zu einer Erniedrigung der im Körper zirkulierenden Androgene. Jedoch bleibt von dieser Hemmung der Androgenproduktion in den Testes, die Synthese von Testosteron und Dihydrotestosteron in der Nebennierenrinde unbeeinflusst (Fuhrmann et al., 1998; Labrie et al., 1989; Labrie et al., 1988). In Kombination mit einer Antihormontherapie kann eine maximale Androgenblockade, durch die Hemmung der verbleibenden Aktivität des Androgenrezeptors (AR), erreicht werden (Corbin, 1982; Fuhrmann et al., 1998; Labrie et al., 1989; Labrie et al., 1993; Lieberman et al., 2001). Die zurzeit verwendeten Antihormone sind synthetische steroidale und nicht-steroidale Substanzen, die, wie Androgene, an die Ligandenbindedomäne (LBD) des ARs

binden und dessen Aktivität hemmen (Balk, 2002; Culig et al., 2002). In der Therapie verwendete Antihormone sind z. B. Cyproteroneacetat (CPA), Casodex (Cas, auch Bicalutamid genannt) und Hydroxyflutamid (OH-F). Man unterscheidet hier zwischen partiellen (CPA) und kompletten Antagonisten (OH-F und Cas). Die Hemmung des AR führt letztlich zur Hemmung des Krebswachstums (Fuhrmann et al., 1998). Eine bekannte Wirkungsweise der Antihormone ist, dass der antihormongebundene AR mit sog. Corepressoren (CoR) interagiert (Burke and Baniahmad, 2000), welche zu einer Hemmung der AR-vermittelten Transkription führen (Goeman und Baniahmad, 2004) (Dotzlaw et al., 2002; Dotzlaw et al., 2003). Die molekularen Mechanismen, welche hinter der Hemmung des AR stehen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

### **2.1.1 Der Androgen-unabhängige Prostatakrebs**

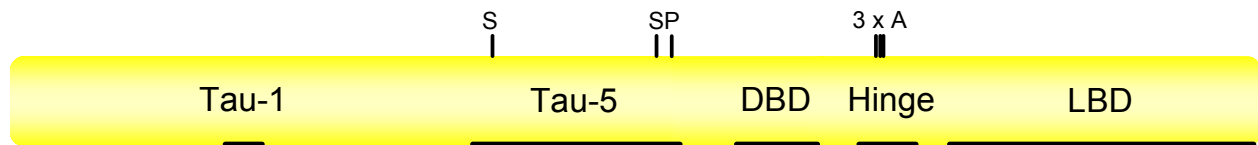
Die Behandlung des Prostatakarzinoms mit Antihormonen und mittels der Hemmung der endogenen Androgensynthese ist in den meisten Fällen nur für einen begrenzten Zeitraum von ca. 12-24 Monaten erfolgreich. Danach entsteht in fast allen Fällen ein Androgen-unabhängiges Prostatakarzinom. Androgen-unabhängig bedeutet, dass der Krebs trotz fortlaufender Therapie erneut proliferiert. Jedoch ist es wichtig zu bemerken, dass auch der Androgen-unabhängige Prostatakrebs immer noch auf die Aktivität des AR angewiesen ist (Brinkmann and Trapman, 2000; Craft et al., 1999; Fuhrmann et al., 1998; Zegarra-Moro et al., 2002). Denn wird in Androgen-unabhängig wachsenden Prostatakrebszelllinien die Expression des AR gehemmt, so kommt es wiederum zu einer Hemmung der Proliferation (Brinkmann and Trapman, 2000; Fuhrmann et al., 1998; Liao et al., 2005). Die Ursachen für ein Hormon-unabhängiges Wachstum dieser Zellen sind sehr vielfältig. Zum einen kann es zu einer Überexpression des Rezeptors durch eine Amplifizierung des AR-Gens kommen (Visakorpi et al., 1995). Ebenso treten Mutationen im AR auf, welche die Aktivierung des Rezeptors entweder durch andere Liganden oder sogar durch die in der Therapie verwendeten Antihormone ermöglichen (Hara et al., 2003; Matias et al., 2002; Taplin et al., 1999; Veldscholte et al., 1990). Solche Mutationen treten häufig in der Ligandenbindedomäne (LBD) des Rezeptors auf, was die Ligandenspezifität erniedrigt. Es wurde auch beschrieben, dass das Gleichgewicht der Cofaktoren, Coaktivatoren (CoA) und Corepressoren (CoR) verändert sein kann, was eine



effiziente Hemmung durch die CoRen verringert (Gregory et al., 2001; Liu et al., 2002). Eine weitere wichtige Rolle in der Androgen-unabhängigen Aktivierung des ARs spielen zelluläre Signaltransduktionswege, wie z. B. der PKA- (Proteinkinase A) und der HER2/neu-Signalweg (Craft et al., 1999; Weigel and Zhang, 1998). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), zu einer verminderten Interaktion zwischen AR und dem CoR SMRT führt (Dotzlaw et al., 2002).

## **2.2 Der Androgenrezeptor**

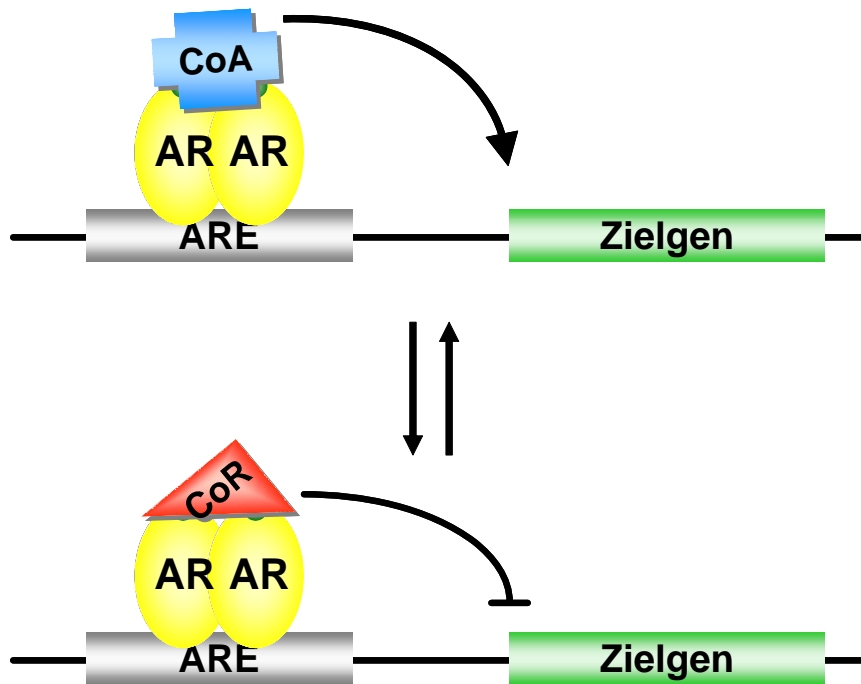
Der Androgenrezeptor (AR) gehört zur Familie der Kernhormonrezeptoren (KHR). Innerhalb der KHR-Superfamilie zählt der AR zu den Steroidhormonrezeptoren (SHR), wie auch der Östrogen-, Progesteron-, Mineralokortikoid- und der Glucocorticoidrezeptor (ER, PR, MR und GR). Neben diesen SHRen zählen der Vitamin D3-, der Thyroidhormon- und der Retinsäurerzeptor ebenfalls zur KHR-Superfamilie. Der AR ist wie alle Kernhormonrezeptoren ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor (Evans, 1988). Eine veränderte Funktion des Rezeptors korreliert mit verschiedenen Krankheitsbildern: dem Prostatakrebs, dem Androgeninsensivitätssyndrom (Moehren et al., 2004) und der spinalen und bulbaren Muskelatrophie (SBMA) (Tenbaum and Baniahmad, 1997). Klassischerweise hat der AR eine in drei Domänen unterteilte Struktur: Die Carboxy-(C)-terminale Ligandenbindedomäne (LBD), eine DNA-Bindedomäne (DBD) und der hauptsächlich für die Transaktivierung verantwortliche Amino-(N)-Terminus (Abbildung 2-1) (Brinkmann et al., 1999; Taplin and Balk, 2004). Die AF-1 lässt sich in zwei unabhängige Domänen Tau-1 und Tau-5 unterteilen (Callewaert et al., 2006; Gast et al., 1998; Jenster et al., 1995; Jenster et al., 1991; Metzger et al., 2003; Simental et al., 1991). Die DBD besteht aus zwei Zinkfingerdomänen, von denen die N-terminale Domäne hauptsächlich die DNA-Bindung vermittelt und die C-terminale Domäne eine Rolle in der Dimerisierung des Rezeptors spielt (Renaud and Moras, 2000; Sack et al., 2001). Zwischen der DBD und der LBD liegt die sog. *Hinge*-Region. In dieser flexiblen Domäne befindet sich das Kernlokalisierungssignal, welches die Translokation des Rezeptors in den Zellkern vermittelt (Baumann et al., 1999; Jenster et al., 1993).



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des AR.** Dargestellt ist der AR mit seinen C-terminalen Aktivierungsdomänen (Tau-1 und Tau-5), der DNA-Bindedomäne (DBD), der flexible Hinge-Region und der C-terminalen Liganden-Bindedomäne (LBD). Ebenso sind die SUMOylierungsstellen (S), die drei Acetylierungsstellen (A) und die für das Wachstum wichtige Phosphorylierungsposition (P) angegeben. Die Zahlen geben die Aminosäureposition an.

Kernhormonrezeptoren (KHR) vermitteln die Wirkung von Hormonen. In Abwesenheit seiner natürlichen, agonistischen Liganden, Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT), befindet sich der AR an Chaperone gebunden im Zytoplasma. In diesem Zustand liegt der Rezeptor in einer transkriptionell inaktiven Form vor. Binden Hormone an die LBD des AR so ändert sich dessen Konformation in einer solchen Weise, dass die Interaktion mit den Chaperonen verloren geht (Georget et al., 1997; Jenster et al., 1993). Daraufhin transloziert der Rezeptor in den Nukleus und dimerisiert dort zu einem Homodimer. Im Nukleus bindet das Rezeptordimer an sog. Androgen-Response-Elemente (AREs) in Promotor- und Enhancerbereichen von AR-regulierten Genen (Claessens et al., 2001; Cleutjens et al., 1997; Cleutjens et al., 1996; Roche et al., 1992). Durch die Interaktion des Rezeptors mit Cofaktoren (Coaktivatoren (CoA) und Corepressoren (CoR)) wird die Transkription dieser Gene reguliert (Abbildung 2-2). Ist der AR von einem agonistischen Liganden (z. B. DHT oder R1881) gebunden, so wird die Transkription durch die Interaktion mit CoA aktiviert (Collingwood et al., 1999; Glass and Rosenfeld, 2000); in Anwesenheit von antagonistisch wirkenden Antihormonen (z. B. OH-F, CPA oder Casodex) führt die Interaktion des ARs mit CoRen zu einer Hemmung der Genexpression (Fuhrmann et al., 1998).

In dieser Arbeit wird als agonistischer Ligand in den meisten Experimenten R1881 verwendet. R1881 ist als synthetische Substanz deutlich stabiler und potenter als der natürliche Ligand DHT.



**Abbildung 2-2: Die Interaktion von CoA und CoR mit dem AR.** Der Hormon-gebundene Androgenrezeptor (AR) bindet als Dimer an sog. *Androgen Response Elements* (ARE). In Gegenwart von agonistischen Liganden (z. B.: DHT oder R1881) vermitteln Coaktivatoren (CoA) die Aktivierung von Zielgenen. Corepressoren (CoR) reprimieren die Expression von Zielgenen wenn der AR von Antihormonen gebunden ist.

Von diesem herkömmlichen Mechanismus weichen neu identifizierte AR-Zielgene ab, welche in Anwesenheit von agonistischen Liganden über eine Transrepression des ARs reprimiert werden (Baldi et al., 2003; Fu et al., 2002). Zu diesen Genen zählen u. a. TERT (die enzymatisch aktive Untereinheit der Telomerase) und Maspin (He et al., 2005; Zhang et al., 1997). Der Mechanismus der AR-vermittelten Transrepression ist noch weitestgehend unbekannt.

Die Aktivität des AR wird zudem auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. So führt beispielsweise die SUMOylierung des AR zu einer Hemmung seiner Transaktivierungskapazität (Poukka et al., 2000). Die Histonacetyltransferasen (HATs) p300 und p/CAF führen zur Acetylierung des AR, was in einer verstärkten Transaktivierung resultiert (Fu et al., 2000; Fu et al., 2002). Ausserdem wird der AR an verschiedenen Positionen phosphoryliert (Faus and Haendler, 2006). Die Phosphorylierung am Tyrosin (Y) an der Position 534 scheint hier auch einen wichtigen Einfluss auf das Wachstum von Prostatatumoren zu haben (Guo et al., 2006).

Des Weiteren sind verschiedene andere Signaltransduktionswege an der Hormon-abhängigen und -unabhängigen Aktivierung des AR beteiligt (Weigel and Zhang, 1998).

Neben der durch den AR vermittelten transkriptionellen Regulation, vermittelt der Rezeptor das sog. *rapid signalling*. Diese schnellen Effekte werden durch die Aktivierung von MAP-Kinasen erreicht, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 führen. Die Antihormone OH-F und Casodex scheinen auf diese Wirkung des AR keinen hemmenden Einfluss zu haben (Peterziel et al., 1999). Die Hemmung der AR-Aktivität scheint eine essentielle Rolle in der Behandlung des Prostatakrebses zu spielen, daher wird im Weiteren die Funktionsweise der CoRen näher erklärt werden.

### **2.3 Corepressoren**

Wie zuvor beschrieben führt die Bindung von Androgen-Antagonisten an den AR zu einer Hemmung der Transkription. Diese Hemmung der AR-Aktivität wird durch sog. Corepressoren vermittelt. CoRen sind Faktoren, die selbst keine DBD besitzen und somit nicht direkt an die DNA binden können. Klassischerweise werden die bekannten CoRen in folgende Gruppen aufgeteilt: SMRT, NCoR, Alien und Hairless, welche in Hormon-sensitiver Weise an den AR binden (Chen and Evans, 1995; Dressel et al., 1999; Horlein et al., 1995; Potter et al., 2001); Hormon-abhängige CoRen sind RIP140 und LCoR (Fernandes et al., 2003; Zilliacus et al., 2001); SUNCoR und PSF sind CoRen, die unabhängig von Liganden mit dem AR interagieren können (Mathur et al., 2001; Zamir et al., 1997). Die transkriptionelle Repression der CoRen wird hauptsächlich durch die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen vermittelt. Zu diesen Faktoren zählen Histondeacetylasen (HDACs) und Histonmethyltransferasen (HMTs) (Baniahmad, 2005; Wang et al., 2005).

Wichtig für die Hemmung der Transaktivierung des ARs in Gegenwart von Androgen-Antagonisten sind die Hormon-sensitiven CoRen SMRT, NCoR und Alien, deren Funktion im Folgenden näher erklärt werden soll.

### 2.3.1 SMRT und NCoR

*Silencing mediator of RAR* (Retinsäurerezeptor) *and TR* (Thyroidhormonrezeptor) (SMRT) und *Nuclear receptor Corepressor* (NCoR) wurden als erste CoRen für die KHRen identifiziert (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). Beide Proteine sind sehr homolog und interagieren über mehrere Interaktionsdomänen in ihren C-Termini mit dem TR (Cohen et al., 2001; Hu et al., 2001). Diese Interaktionsdomänen werden als CoRNR-Boxen bezeichnet. CoRNR-Boxen sind charakterisiert durch eine konservierte Sequenzabfolge: LXXXIXXXI/L (L: Leucin, I: Isoleucin, X: beliebige AS). SMRT besitzt zwei und NCoR enthält drei Interaktionsdomänen (Cohen et al., 2001). Auch die Interaktion mit dem AR wird von den C-Termini der beiden Corepressoren vermittelt. Ob auch für den AR die CoRNR-Boxen die minimalen Interaktionsdomänen darstellen ist noch unklar.

Die Repressionsaktivität von SMRT und NCoR wird größtenteils durch die Rekrutierung von HDACs vermittelt (Guenther et al., 2000; Heinzl et al., 1997; Jones et al., 2001; Li et al., 2000; Underhill et al., 2000; Wen et al., 2000). HDACs führen zu einer Deacetylierung der Lysine in Histonen, was daraufhin zu einer kompakteren, für die Transkriptionsmaschinerie schwerer zugänglichen, Chromatinstruktur führt. Diese ursprünglich nur als Hormon-sensitiv bezeichneten CoRen binden an den AR in Gegenwart von agonistischen und antagonistischen Liganden (Dotzlaw et al., 2003). Jedoch kommt es zur Repression der AR Transaktivierung nur im Fall des Antihormon-gebundenen Rezeptors (Dotzlaw et al., 2003).

### 2.3.2 Alien

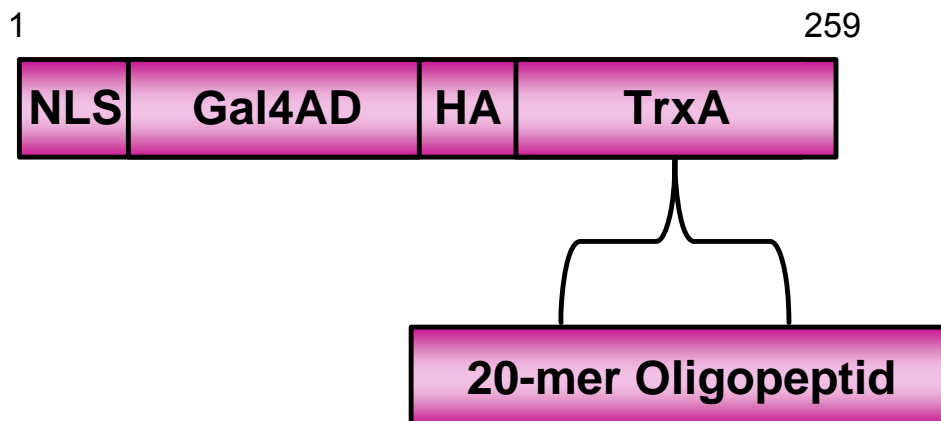
Alien ist ein hochkonserviertes Protein, von dem zwei Isoformen beschrieben sind. Alien $\alpha$  (auch als TRIP15 bezeichnet) besteht aus 305 Aminosäuren und die etwas längere Isoform des Proteins (443 AS), welche als Alien $\beta$  (oder auch CSN2) bezeichnet wird. Alien $\beta$  ist ein im embryonalen, fetalen und adulten Gewebe vielfältig exprimiertes Protein, das als Untereinheit des COP9-Signalosomes gefunden wurde (Chamovitz and Glickman, 2002; Henke et al., 1999; Schwechheimer and Deng, 2001; Seeger et al., 1998; Wei and Deng, 1999). Die Einbindung von Alien $\beta$  in das COP9-Signalosom erfolgt über dessen C-terminale PCI-Domäne, welche in der

kürzeren Isoform nicht vorhanden ist. Das COP9-Signalosom ist ein 450 kD großer Multiprotein-Komplex, der zuerst als Repressions-Komplex der lichtinduzierten Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* gefunden wurde (Wei and Deng, 1999). Dieser Komplex ist von der Hefe bis zum Menschen wahrscheinlich in allen eukaryotischen Organismen zu finden (Wee et al., 2002). Alien $\alpha$  wurde ursprünglich in einem Hefe Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner des Thyroidhormonrezeptors (TR; zählt ebenso zu den KHRen) identifiziert (Lee et al., 1995) und später auch als CoR für verschiedene andere KHRen charakterisiert (Altincicek et al., 2000; Dressel et al., 1999; Polly et al., 2000). Alien $\alpha$  besitzt eine saure N-terminale Domäne, einen hydrophoben C-Terminus und zwei mutmaßliche  $\alpha$ -helikale Strukturen. Des Weiteren enthält das Protein einen putativen Zinkfinger sowie eine mögliche Kernlokalisationssequenz. Alien befindet sich hauptsächlich im Nukleus, ist aber auch im Zytoplasma lokalisiert. Alien $\alpha$  interagiert mit dem N-Terminus des AR (Moehren et al., 2007). Alien $\alpha$  besitzt zwei autonome Repressionsdomänen. Ein Weg der Alien-vermittelten Repression erfolgt durch die Interaktion mit dem CoR Sin3A, welcher in einem Multiproteinkomplex mit HDACs assoziiert ist (Dressel et al., 1999; Moehren et al., 2004; Zhang et al., 1997). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Alien mit einer Histonmethyltransferase-Aktivität assoziiert ist (H. Nazareus, Diplomarbeit 2005). Schließlich wurde beschrieben, dass Alien $\alpha$ , in Kooperation mit NAP-1 (*Nucleosome Assembly Protein-1*), eine Rolle im Aufbau von Nucleosomen spielt (Eckey et al., 2007) und dadurch ebenfalls Chromatin-vermittelte Repression induzieren könnte.

Wie erwähnt interagiert Alien $\alpha$  ebenso wie SMRT über seinen C-Terminus mit dem N-Terminus des AR. Um für eine neuartige Strategie in der Prostatakrebstherapie einen spezifisch mit dem AR interagierenden CoR zu konstruieren, könnten vollkommen neue, kurze Interaktionsmotive von Nutzen sein. Eine umfangreiche Quelle kurzer zufälliger Peptide stellen die sog. Peptidaptamere dar.

## 2.4 Die Peptidaptamere

Auf der Suche nach weiteren AR-Bindemotiven wurden in dieser Arbeit sog. Peptidaptamere verwendet. Peptidaptamere sind kurze, in ihrer Sequenz (ca. 20 Aminosäuren (AS)) zufällig zusammengestellte, Proteine (Hoppe-Seyler and Butz, 2000). Sie stellen eine neue Klasse von Molekülen dar, welche das Potenzial besitzen, mit hoher Affinität und Spezifität an andere Proteine zu binden (Buerger and Groner, 2003; Hoppe-Seyler and Butz, 2000). Die hier zur Verfügung stehende Peptidaptamerbibliothek in Plasmidform kodiert für 20-mer Oligopeptide (Abbildung 2-3).



**Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Peptidaptamerbank.** In dieser Arbeit wurde eine Peptidaptamerbank in Plasmidform eingesetzt. Jedes Plasmid kodiert für ein 259 Aminosäuren großes Peptidaptamer, das jeweils aus einem zufällig zusammengestellten 20-mer Oligopeptid (bzw. 60-mer Oligonukleotid) besteht. Dieses ist in den aktiven *Loop* des *E. coli* Thioredoxin A (TrxA) integriert, welches dem kurzen Peptid eine stabile Struktur vermittelt. Für eine potenzielle Antikörperdetektion ist ein Hämagglutinin-epitop (HA) vorhanden. Zusätzlich enthält das Konstrukt eine Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4AD) und ein Nuclear Localisation Signal (NLS). Die Zahlen geben die Aminosäureposition an.

Bei der Synthese der randomisierten Sequenzen wurde durch die Verwendung sog. NNK-Triplets (N= G, A, T oder C und K= G oder C), welche für alle 20 AS kodieren, aber in nur einem Stop-Codon resultieren können, die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Stop-Codons herabgesetzt. Diese Oligonucleotide wurden in das *E. coli* thioredoxin A (*trxA*) Gen eingefügt. TrxA dient dem kurzen Oligopeptid als *Scaffold*, das heißt es vermittelt eine gewisse Strukturstabilität. Die Komplexität dieser Peptidaptamerbibliothek umfasst ca.  $2 \times 10^8$  verschiedene Peptide. Um diese Peptidaptamere in einem modifizierten Hefe Zwei-Hybrid-Screen als Beute einzusetzen, wurden diese an eine Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) fusioniert. In dieser Arbeit wurde der Hefe Zwei-Hybrid-Screen modifiziert und wird im Folgenden

als Aptamer-Screen bezeichnet. Ebenso enthalten die Peptidaptamere ein Hämagglutininepitop für die Möglichkeit, die verschiedenen Peptidaptamere später mittels Antikörper zu detektieren. Zusätzlich befindet sich am N-terminalen Ende ein *Nuclear Localisation Signal* (NLS) (Hoppe-Seyler and Butz, 2000).

Durch ihre Eigenschaft spezifisch mit Proteinen zu interagieren und diese in ihrer Funktion zu blockieren, kann man Peptidaptamere nicht nur für die Aufdeckung molekularer Mechanismen, sondern auch für eine neuartige Klasse diagnostischer und therapeutischer Strategien verwenden (Buerger and Groner, 2003; Hoppe-Seyler and Butz, 2000). So wurde bereits erfolgreich ein Peptidaptamer isoliert, das mit dem Herpes simplex Type 16 Protein E6 interagiert und dadurch zur Apoptose von humanen Papillomavirus (HPV)-positiven Zellen führt (Butz et al., 2000). Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte ein weiteres Peptidaptamer, das durch die Bindung an das Hepatitis Virus Core Protein, den Aufbau des Hepatitis B Capsid und dessen Replikation blockiert (Butz et al., 2001). Des Weiteren wurden Peptidaptamere beschrieben, die durch Interaktion mit Proteinen, die im Ablauf des Zellzyklus beteiligt sind, den Fortlauf des Zellwachstums hemmen. Zwei Beispiele sind hier die Proteine E2F1 und EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Buerger et al., 2003; Fabrizio et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden die Peptidaptamere im Hinblick auf die Anwendung in einer möglichen Peptidtherapie genutzt.

#### **2.4.1 Die Peptidtherapie**

Eine neuartige Therapiestrategie, die dazu dient Moleküle in Zellen einzubringen, ohne zusätzliches DNA-Material in den Körper einzuschleusen, ist die Peptidtherapie. Aufgrund ihrer geringen Größe eignen sich Peptidaptamere besonders für den Einsatz in einer solchen Strategie, denn die erste Barriere in der Peptidtherapie, ist das Einschleusen des Moleküls in die Zelle. Die Zellmembran ist, abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie sehr kleine, stark lipophile Moleküle, für Peptide und Proteine generell impermeabel. Bereits 1988 beschrieb eine Arbeitsgruppe, dass die Fusion von Peptiden an eine Protein-Transduktions-Domäne (PTD), in diesem Fall eine Domäne des HIV-TAT (*Humanes Immundefizienz Virus-Transactivator of Transcription*) Proteins, das Durchdringen der Zellmembran ermöglicht. Im Laufe der Zeit wurden noch weitere PTDs beschrieben. Zu diesen



---

gehören unter anderen: HSV VP22 (Herpes simplex Virus Protein VP22) und ANTP (Antennapedia) (Elliott and O'Hare, 1997; Frankel and Pabo, 1988; Green and Loewenstein, 1988; Prochiantz, 2000). Diesen PTDs ist gemein, dass sie einen großen Anteil basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) enthalten, welche den Kontakt mit der Zellmembran ermöglichen. Versuche, das Potenzial dieser PTDs zu erhöhen, ergaben, dass eine Abfolge von 9 L-Argininen die daran gekoppelten Moleküle 20-mal effizienter in die Zellen transportierten als eine Fusion mit HIV-TAT. Für ein D-Arginin Oligomer wurde sogar eine 100-fach größere Potenz in Bezug auf Jurkat-Zellen beschrieben (Wender et al., 2000). In einer anderen Arbeit wurde beschrieben, dass eine Abfolge von Lysininen ebenfalls zu einem äußerst effizienten Transport von Proteinen in Zellen führt (Mai et al., 2002). Besonders wichtig ist, dass Proteine, die über diesen Weg in Zellen eingebracht werden, auch wieder biologisch aktiv sein können. Hier scheint es einen Zusammenhang zwischen der Größe des Proteins, der benötigten Zeit für den Transport und der Zeit bis zum Wiedererlangen der biologischen Funktion zu geben. Während kleine Peptide mit einer Größe von etwa 20 kDa (Kilodalton) innerhalb kürzester Zeit in Zellen transportiert wurden und aktiv waren, so brauchte man ca. 5 Minuten (Min.), um die Aktivität eines 120 kDa großen Protein nachzuweisen (Schwarze et al., 1999). Hierbei ist zu bedenken, dass möglicherweise nach dem Transport von aufgereinigten Proteinen in die Zellen die Aktivität erst wieder nach der korrekten Faltung des Proteins unter Mithilfe von Chaperonen erlangt wird (Schwarze et al., 1999).

## **2.5 Zielsetzung der Arbeit**

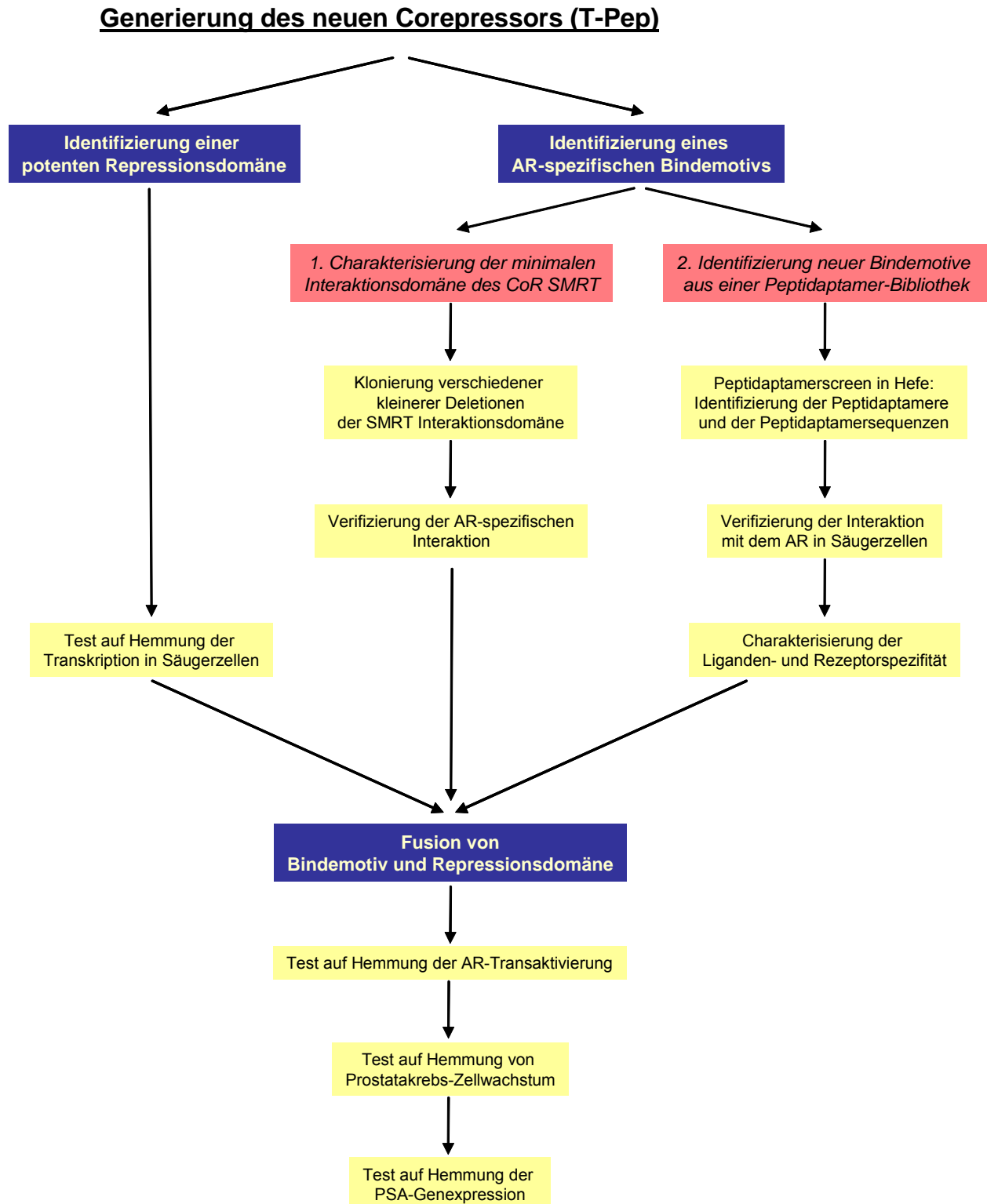
Die Möglichkeiten in der nicht-operativen bzw. der Operations-begleitenden Therapie des Prostatakarzinoms beschränken sich zurzeit auf die Hemmung der körpereigenen Androgensynthese und die Gabe von Androgen-Antagonisten (Antihormonen). Die dadurch im Wachstum blockierten Prostatakrebszellen entwickeln nach einem gewissen Zeitraum eine Resistenz und werden Androgen-unabhängig. Trotzdem und beachtenswerterweise sind auch diese Androgen-unabhängigen Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation, abhängig von der Aktivität des Androgenrezeptor.

Das Hauptziel dieses Projektes ist einen neuartigen CoR (T-Pep: therapeutisches Peptid) zu synthetisieren, der potenziell in der Behandlung des Prostatakarzinoms das Hormon-abhängige Wachstum des Tumors hemmen kann. Ein solcher CoR sollte spezifisch die Aktivität des ARs hemmen, ohne die Funktion der anderen KHRen zu beeinflussen. Denn die bisher bekannten CoRen dienen auch als Repressoren für einige bzw. alle anderen Mitglieder der KHR-Superfamilie. Der Einsatz eines unspezifischen CoRs in der Prostatakrebstherapie würde wahrscheinlich zu zu vielen Nebenwirkungen führen. Für eine potenzielle Peptidtherapie ist das Ziel ebenso, einen möglichst kleinen CoR zu generieren.

Zu den wichtigsten Mechanismen der Androgen-unabhängigen Reaktivierung des ARs zählen die Amplifikation des AR-Gens und ein im Verhältnis zu hoher Anteil der AR-aktivierenden CoAen gegenüber der reprimierenden CoRen. Der potenzielle Einsatz eines neuartigen CoRs könnte möglicherweise die größere Menge an AR hemmen und das Missverhältnis gegenüber den CoA ausgleichen bzw. zu Gunsten der CoRen verschieben. Da die Corepressoren eine wichtige Rolle in der Hemmung der Aktivität des AR spielen, soll zunächst nachgewiesen werden, dass diese tatsächlich eine Rolle in der Proliferation des Prostatakarzinoms spielen.

Die Generierung neuer CoRen (T-Peps) umfasst wiederum zwei aufeinander aufbauende Schritte (Abbildung 2-4): Zunächst sollen kurze Motive identifiziert werden, welche liganden-abhängig und spezifisch mit dem AR interagieren. Zur Konstruktion eines neuen therapeutischen Peptids muss das Bindemotiv an eine starke Repressionsdomäne fusioniert werden. Für das T-Pep soll dann funktionell die spezifische Interaktion mit dem Liganden-gebundenen AR, die Hemmung der Transaktivierung des Rezeptors sowie des Prostatakrebszellwachstums dargestellt werden.

## 2.6 Arbeitsstrategie zur Generierung des neuen Corepressors



**Abbildung 2-4: Übersicht über die Arbeitsstrategie zur Herstellung des neuen CoRs (T-Pep).** Dargestellt sind die einzelnen methodischen Schritte von der Identifizierung eines AR-spezifischen Bindemotivs und der Identifizierung einer potenten Repressionsdomäne bis zur Charakterisierung der Eigenschaften des Fusionsproteins aus Bindemotiv und Repressionsdomäne (T-Pep).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

Analysenwaage	METTLER, KERN
Autoklav	H + P LABORTECHNIK
Brutschränke (Bakterien und Hefen)	HERAEUS, MEMMERT, HARNISCHMACHER
CO <sub>2</sub> -Brutschränke	THERMO
Elektrophoreseapparaturen für Agarosegele	PHARMACIA, OWL, HARNISCHMACHER
Hitzesterilisator	HERAEUS
Kühlschrank (4°C)	BOSCH, LIEBHERR
Kühltruhe (-20°C)	BOSCH, LIEBHERR
Kühltruhe (-80°C)	REVCO SCIENTIFIC INC.
Lightcycler	ROCHE
Magnetrührer IKA-Combimag RCH	JANKE & KUNKEL
Mikroskop	ZEISS
Mikrowelle	PRIVILEG, EMD
Multipipette	GILSON
pH-Meter	SCHOTT, WTW
Pipettierhilfe (elektrisch)	HIRSCHMANN, INTEGRA BIOSCIENCES
Quarzküvetten	HELLMA
Spannungsquellen	PHARMACIA, IBI, BIO RAD, SCHÜTT
Spektralphotometer	BIOCHROM, PHARMACIA, LKB
Sterilwerkbank	BDK, HERAEUS
Tischzentrifugen	HETTICH
Ultrazentrifugen	BECKMANN L70 u. XL70
UV-Sofortbildkamera	POLAROID
UV-Transilluminator (254nm)	INTAS
UV-Transilluminator (366nm)	BACHOFER
Variopipetten	GILSON
Wasserbäder	KÖTTERMANN, JULABO, MEMMERT, GFL

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Distritips (für Multipipette)	GILSON
Einmalhandschuhe (Latex, Nitril)	BRAUN, HARTMANN, KIMBERLY-CLARK
Einmalküvetten	SARSTEDT
Einmalösen	NUNC
Einmalpipetten	BRAND, EPPENDORF, GREINER
Einmalpipetten (mit Filter)	BIOZYM, GREINER
Einmalspritzen	ECTON, OMNIFIX
Kanülen	TERUMO
Kapillaren für Lightcycler	ROCHE
Papiertücher (Fusselfrei)	KIMWIPE
Pasteurpipetten	BRAND, ASSISTENT
Petrischalen (Ø 9,4 / 14,5cm)	GREINER
Petrischalen, beschichtet für Zellkultur (Ø 9,4 / 14,5cm) und 6-well Zellkulturschalen	GREINER
Quick-Seals™	BECKMANN
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	EPPENDORF, SARSTEDT
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	TPP, GREINER
Reaktionsgefäße (PCR: 0,2 ml)	BIOZYM
Sterilfilter	SARTORIUS
Zelleinfrierbehälter	NALGENE, TECHNOMARA

### 3.3 Chemikalien und fertig zum Gebrauch erhältliche Baukästen ("Kits")

Agar	GIBCO
Agarose	ROTH
Adenosintriphosphat (ATP)	ROTH
Aktivkohle	ROTH
Ampicillin, Natriumsalz	ROTH
Bacto-Trypton	DIFCO und APPLICHEM
β-Mercaptoethanol	MERCK
Bromphenolblau	SERVA
Calciumchlorid	ROTH
Cäsiumchlorid	ROTH
Casodex	ASTRA ZENECA
Chloroform	ROTH
Coenzym A	PJK GMBH
Cyproteroneacetat (CPA)	SIGMA

---

Dexamethason	SIGMA
Dihydrotestosteron DHT	SIGMA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH
DMEM	INVITROGENGIBCO
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA
DNA-Längenstandards	FERMENTAS
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	FERMENTAS
EDTA	MERCK
Essigsäure	MERCK
Ethanol	MERCK
Ethidiumbromid	ROTH
Ficoll 400	SIGMA
Fötale Kälberserum (FCS)	INVITROGEN/GIBCO
Geneticin (G418)	INVITROGEN
Glucose	ROTH
Glycerin	ROTH
HEPES	ROTH
Hefeextrakt	OXOID
High Purity Plasmid Midi- und Maxiprep	MARLIGEN
Hydroxyflutamid (OH-F)	LKT LABORATORIES INC.
Hygromycin	INVITROGEN/GIBCO
Isopropanol	ROTH
Kalbsthymus-DNA	SIGMA
Kaliumacetat	ROTH
Kaliumchlorid	ROTH
Kalium-di-hydrogenphosphat	ROTH
Di-Kaliumhydrogenphosphat	ROTH
Lithiumchlorid	ROTH
Luziferin	PJK GMBH
Magnesiumacetat	ROTH
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	ROTH
Methanol	MERCK
Natriumacetat	ROTH
Natriumchlorid	ROTH
Natriumhydrogenphosphat	ROTH
Natriumhydroxid	ROTH
Natriumpyruvat	SIGMA und INVITROGEN
o-Nitro-phenol- $\beta$ -Galactopyranosid (ONPG)	APPLICHEM
Penicillin-Streptomycin	GIBCO
Phenol	ROTH
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA

---

PMSF	SERVA
Progesteron	SIGMA
R1881 (Methyltrienol)	PERKIN ELMER
RPMI	INVITROGEN/GIBCO
Salzsäure	ROTH
Tris-Base	SIGMA
Triton-X-100	MERCK
TriFast	PEQLAB
Trypsin	INVITROGEN/GIBCO
Wizard DNA Aufreinigungssystem	PROMEGA
Xylencyanol	SIGMA

### **3.4 Oligonukleotide und Enzyme**

Oligonukleotide	EUROGENTEC
CIAP (Alkalische Phosphatase aus Rindern)	FERMENTAS
Klenow-Fragment	FERMENTAS
Restriktionsendonukleasen	FERMENTAS, BOEHRINGER, AMERSHAM
RNase A	SIGMA
T4-DNA Ligase	FERMENTAS, ROCHE
Taq-DNA-Polymerase	INVITROGEN
T4-DNA Ligase	FERMENTAS, ROCHE
qRT-PCR Kit	INVITROGEN
RT-PCR Kit	GIBCO

### 3.5 Verwendete Oligonukleotidsequenzen

Oligobezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SCoRNR1Fw	CCCGGATCCGTCACCCTGGCCCAGCAC
SCoRNR1Re	GGGGGGGCTAGCGTGGTGCCGGGTGTAGTCC
SCoRNR2Fw	GGGGGATCCGCCAGCACCAACATGG
SCoRNR2Re	GGGGGGGCTAGCATATTTACCCATGAGTGC
SMRTID1Fw	CCCGGATCCCACCTCCCACACCTGCG
SMRTID1Re	GGGGGGGCTAGCGTGATGGCGGGCATATTG
SMRTID2Fw	CCCGGATCCCCTGAATACAATATCAGCCAGC
SMRTID2Re	GGGGGGGCTAGCCTGCGAGCAGAGCAGTG
MMTVYFw	CCCCCGAATTCGCTCAGATCCAAGCTTGTCG
MMTVYRe	CCCCCATCGATGGACCTCTGGAAAGTGAAG
PSAYFw	CCCCCGAATTCAGGGATCAGGGAGTCTCACA
PSAYRe	CCCCATCGATAACCTTCATTCCCAGGACT
aptamerfwll	ATTAATTCGAGCCTCCAA
aptamerre	AGGTAGACAAGCCGACAACC
G97AFw	CCCCCAATTGCTCTGACCAGGCAAAAAC
G97ARe	CCCCCAATTGAACTGTTGAATGAGCCCCC
PSAFw	ACTGCATCAGGAACAAAAGCGTGA
PSARe	CGCACACACGTCATTGGAAATAAC
b-actin-rt-fw	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGA
b-actin-rt-re	CACGATGGAGGGGAAGACG

### 3.6 Arbeitsvorbereitungen

Gelpuffer und Nährmedien wurden mit doppelt destilliertem, alle anderen Lösungen mit Milliporefilter-gereinigtem Wasser ( $U > 18 \text{ M}\Omega$ ) angesetzt. Sterile Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren erhalten. Üblicherweise wurden für das Ansetzen von gebrauchsfertigen Puffern hochkonzentrierte Stammlösungen verwendet. Die Konzentrationsangaben der Puffer und Lösungen beziehen sich jedoch auf die Endkonzentration, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben.

Alle in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

### 3.7 Arbeiten mit Bakterienkulturen

#### 3.7.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die *E. coli* Stämme HB101 LM1035 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969) und JM110 verwendet. Der Bakterienstamm HB101 trägt eine endogene Streptomycinresistenz. Der Bakterienstamm JM110 (Yanisch-Perron et al.,



1985) wurde verwendet, wenn die Methylierung durch Dam- oder Dcm-Methylasen in der DNA für spätere Versuche verhindert werden musste.

### 3.7.2 Wachstum und Lagerung von Bakterien

Die Vermehrung von *E. coli* erfolgte im Schüttelinkubator bei 37°C in LB-Flüssigmedium. Einzelklone wurden durch das Ausstreichen auf Agar-Platten gewonnen. Zur längerfristigen Lagerung wurden Aliquots einer Übernachtskultur auf eine Glycerin-Endkonzentration von 50% eingestellt und bei -80°C aufbewahrt.

#### **LB-(Lauria-Bertani) Flüssigmedium**

10 g Bactotrypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ad 1 l ddH<sub>2</sub>O; auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

#### **Agar-Platten**

1 l LB-Medium wird nach Zugabe von 15 g Agar autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, und in Petrischalen (Ø 9,4 cm) gegossen. Vor dem Gießen konnten eventuell benötigte Antibiotika hinzugefügt werden. Bis zum Gebrauch werden die Agar-Platten bei 4°C und im Dunkeln gelagert.

Bei der Plasmid-Maxi-Präparation mittels Cäsiumchloridaufreinigung (Kapitel 1.7.3.1) erfolgte die Vermehrung in TB-Medium, welches ein dichteres Wachstum der Bakterien erlaubt.

#### **TB-(Terrific Broth)-Flüssigmedium**      **Phosphatpuffer (10 ×)**

12 g Bactotrypton

0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

24 g Hefeextrakt

0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4 ml Glycerin

add 1 l ddH<sub>2</sub>O

→ autoklavieren und kurz vor Gebrauch 10 × Phosphatpuffer und Antibiotikum zugeben

Besaßen die Bakterien eine Antibiotikum-Resistenz (Selektionsmarker transformierter Plasmide), so wurde dem Medium dieses Antibiotikum in den folgenden Konzentrationen zugegeben:

	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin:	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol:	34 mg/ml in Methanol	20 µg/ml
Kanamycin:	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	25 µg/ml
Tetracyclin:	7,5 mg/ml in EtOH	15 µg/ml
Streptomycin:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	10 µg/ml

### 3.7.3 Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien

Alle Arbeiten, mit Ausnahme der Aufzucht der Bakterien, wurden mit eiskalten Puffern und auf Eis durchgeführt. Das Protokoll ist angelehnt an die Anleitung nach (Inoue et al., 1990). Die Zentrifugen wurden vorgekühlt.

25 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht (ÜN) hoch gezogen. Von dieser ÜN-Kultur wurden entsprechend so viele ml Kultur in 450 ml frisches LB überimpft, so dass eine OD<sub>600</sub> von 0,07-0,1 eingestellt wurde. Diese Kultur wurde bei 18°C so lange geschüttelt bis die Bakterien in ihrem Wachstum die logarhythmische Phase erreicht hatten (OD<sub>600</sub>: ca. 0,6). Anschließend wurde die Kultur zunächst für 10 min auf Eis gestellt und dann bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und daraufhin erneut bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 9,3 ml eiskaltem TB-Puffer und 0,7 ml DMSO resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die kompetenten Bakterien in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

<u>TB-Puffer:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
Pipes	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM

### 3.7.4 Transformation von Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Die Herstellung kompetenter Bakterien ist im Kapitel 3.7.3 beschrieben. Die Bakterienmembran wird durch diese Prozedur so verändert, dass die Aufnahme von Plasmid-DNA, nach einem noch unbekanntem Mechanismus, wesentlich erleichtert wird.

200 µl transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-100 ng Plasmid-DNA (abhängig davon, ob es sich um Supercoiled-Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz handelte) und 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 37°C. Anschließend wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 4000 rpm., Tischzentrifuge), in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf einer vorgewärmten (37°C) Agar-Platte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach etwa 12 h konnten Einzelkolonien gepickt werden.

## 3.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren (DNA und RNA)

### 3.8.1 Lagerung

Die Lagerung von DNA erfolgte in TE-Puffer bei -20°C. Die Lagerung der RNA erfolgte in H<sub>2</sub>O bei -80°C.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5  
1 mM EDTA pH 8,0

### 3.8.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp)

Diese Methode wurde zur schnellen Analyse einer größeren Anzahl von Plasmid-enthaltenden Bakterienkolonien verwendet (Holmes and Quigley, 1981). Die so gewonnene Plasmid-DNA diente der Restriktionsanalyse, da hierfür kleine Mengen DNA genügen. Ebenso konnte die über Minipräp erhaltene Plasmid-DNA auch für weitere Klonierungsschritte genutzt werden. 3 ml LB-Medium, welches für die Selektion ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Hiervon wurden 1,5 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert

(Tischzentrifuge), der Überstand abgesaugt und das Bakteriensediment in 200 µl TELT-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugegeben, sofort in einem kochenden Wasserbad für 1 min gekocht und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Tischzentrifuge). Nach dem Entfernen des Sediments wurde die DNA mit 2 Volumenteilen (ca. 400 µl) EtOH gefällt (10 min RT), pelletiert (10000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und nach einmaligem Waschen mit 70% EtOH in 30 µl TE-Puffer gelöst. 2 µl dieser Lösung reichen im Allgemeinen für eine Restriktionsanalyse aus. RNaseA wurde direkt im Auftragspuffer mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml zu den Proben hinzugefügt.

**TELT-Puffer:**

50 mM Tris/HCl, pH 7.5  
62,5 mM EDTA  
0,4% (v/v) Triton X-100  
2,5 M LiCl

### **3.8.3 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp)**

#### *3.8.3.1 Cäsiumchlorid Maxipräp*

Diese Methode ermöglicht eine Präparation großer Mengen (1-12 mg) an Plasmid-DNA, die überdies noch sehr rein ist. In dieser Arbeit fand sie für die Präparation von Plasmiden für Transfektionen eukaryotischer Zellen Verwendung. Der Aufschluß der Bakterien und die Gewinnung der DNA erfolgte, mit Modifikationen, nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte in einem Cäsiumchlorid-(CsCl)-Dichte-Gradienten.

Eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium wurde in 400 ml TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und 7-8 h (bis kurz vor Erreichen der stationären Phase) bei 37°C inkubiert. Diesem Ansatz wurde Chloramphenicol (2 ml einer 3,4 %igen (w/v) Stammlösung in EtOH) zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Chloramphenicol hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheiten bakterieller Ribosomen und verhindert somit das weitere Wachstum der Bakterien. Die Proteine des DNA-Replikationsapparats sind jedoch noch längere Zeit stabil.

Die Bakterien wurden pelletiert (15 min, 4°C, 4000 rpm), in 10 ml Lösung I (+ 40 mg Lysozym) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte, bis zur Fällung mit Isopropanol, erfolgten auf Eis. Das Bakterienlysat wurde mit 20 ml frisch angesetzter Lösung II versetzt und für 10 min inkubiert (Denaturierung genomischer DNA). Anschließend wurde der Ansatz mit 15 ml Lösung III neutralisiert und für 10 min inkubiert. Die Bakterientrümmen wurden abzentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 rpm). Der Überstand wurde durch Verbandmull filtriert, auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit 0,6 VT Isopropanol für 15 min bei RT gefällt und zentrifugiert (20 min, RT, 6000 rpm, Heraeus Minifuge). Das so erhaltene Pellet wurde in 3 ml TE gelöst. In dieser DNA-Lösung wurden nun 4,5 g CsCl bei 37°C gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wurden nicht lösliche Bestandteile des Ansatzes durch Zentrifugation entfernt (20 min, RT, 6000 rpm, Heraeus Minifuge). Der Überstand wurde in ein *Quick-Seal™*-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (13 × 51 mm) überführt und so mit ddH<sub>2</sub>O bzw. einer 50 %igen (<sup>w/w</sup>) CsCl-Lösung versetzt, dass ein Gesamtgewicht von 9,5 bis 9,8 g resultierte. Nach dem Verschweissen des Zentrifugenröhrchens erfolgte eine Ultrazentrifugation (>3 h, 4°C, 70000 rpm).

Nach der Ultrazentrifugation wurde die durch Ethidiumbromid visualisierte Plasmid-Fraktion mit Hilfe einer Kanüle abgezogen. Die Entlüftung des verschweißten Zentrifugenröhrchens erfolgte durch das Einstechen einer zweiten Kanüle in das obere Drittel des Röhrchens. Die isolierte Plasmid-Bande wurde in ein neues *Quick-Seal™*-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (13 × 51 mm) überführt, mit einer 50 %igen (<sup>w/w</sup>) CsCl-Lösung erneut auf ein Gewicht zwischen 9,5 und 9,8 g gebracht und, wie oben beschrieben, und für mindestens 6 h, bei 55000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-Bande wurde erneut abgezogen und das Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit CsCl- und H<sub>2</sub>O-gesättigtem Isopropanol entfernt. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde mit 2 VT ddH<sub>2</sub>O verdünnt, um die CsCl-Konzentration zu senken. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 VT Isopropanol bei RT präzipitiert (30 min) und pelletiert (20 min, RT, 6000 rpm). Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 10 min an der Luft getrocknet und in 200 bis 1500 µl TE gelöst. Die Ausbeute und Reinheit der DNA wurde mit einem Spektralphotometer bestimmt (Kapitel 0).

---

<u>Lösung I</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III</u>
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)	0,2 M NaOH	5 M KAc (pH 4,8)
50 mM Glucose	1% SDS	
10 mM EDTA	(frisch ansetzen)	
4 mg/ml Lysozym (frisch zugeben)		

### 3.8.3.2 Säulen Maxi(Midi)präp

Eine schnellere Methode zur Aufreinigung von größeren Mengen an reiner Plasmid-DNA ist mit der Verwendung des *Marligen High Purity Maxi(Midi)prep* Kits möglich. Hierfür wurden 500 ml (100 ml) einer Übernachtskultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) pelletiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden in 10 ml (4 ml) *Cell Suspension Buffer* (E1) sehr gut resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml (4 ml) *Cell Lysis Solution* (E2) wurde die Suspension durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10 ml (4 ml) *Cell Neutralization Buffer* (E3) hinzugefügt und die Suspension erneut durch invertieren gemischt. Es folgte eine Zentrifugation (4000 rpm) für 10 min bei 4 °C. Sobald der Überstand auf Raumtemperatur aufgewärmt war, wurde dieser auf die mit 30 ml (10 ml) *Equilibration Buffer* (E4) behandelten Säulen pipettiert. Um zu verhindern, dass nicht abzentrifugierte Präzipitationsreste auf die Säule gelangen, wurde der Überstand durch eine Gaze gefiltert. Nachdem die Lösung komplett über die Säule gelaufen ist, wurde diese zweimal mit 30 ml (10 ml) *Wash Buffer* (E5) gewaschen. Die an die Säule gebundene Plasmid-DNA wurde mit 15 ml (5 ml) *Elution Buffer* (E6) eluiert und dann mit 10,5 ml (3,5 ml) Isopropanol präzipitiert (30 min, 4000 rpm, 4 °C). Das DNA Pellet wurde mit 5 ml (3ml) 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in ca. 500 µl (200 µl) TE gelöst. Die Ausbeute und Reinheit der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt (Kapitel 0).

### 3.8.3.3 Phenol/Chloroform Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde zur Entfernung von Proteinen aus wässriger DNA-Lösung verwendet. Eine sich anschließende Ethanolpräzipitation diente der Beseitigung von Salzen.

Die wässrige DNA-Lösung wurde zunächst auf ein geeignetes Volumen (mindestens 200 µl) mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 1/10 VT 3 M NaAc pH 5,0 versetzt. Die NaAc-Lösung diente der Gewährleistung einer späteren Fällung. Nach Zugabe von 0,5 Volumenteilen equilibriertem Phenol wurde das Gemisch gründlich auf einem Vortexer vermischt. Dieser Vorgang des intensiven Mixens wurde nach Zugabe gleicher Menge Chloroform/Isoamylalkohols wiederholt. Ein Zentrifugationsschritt (10 min, 11.000 rpm) diente der Phasentrennung. Die obere wässrige, proteinfreie Phase wurde zur Fällung der DNA mit 2 Volumenteilen 100%-igem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation für 15 min bei –80°C bzw. 20 min bei –20°C wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach einer erneuten kurzen Zentrifugation getrocknet. Das Lösen der DNA in TE oder ddH<sub>2</sub>O erfolgte für 30 min auf einem Rüttler.

#### **NaAc-Lösung:**

3 M Natriumacetat  
mit Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt

### 3.8.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen

Durch spektralphotometrische Messung können die Konzentration und der Reinheitsgrad von DNA- und RNA-Lösungen bestimmt werden. Die Konzentration von Plasmid-DNA bzw. aus Zellen isolierter RNA ergibt sich durch die Absorption bei 260 nm nach der Formel:

$$c = OD_{260} \times 50 \times f$$

c = Konzentration der DNA- bzw. RNA-Lösung in µg/ml

f = Verdünnungsfaktor

### 3.8.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II durchtrennen doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Es können, je nach Enzym, überhängende oder glatte Enden (*sticky-* bzw. *blunt-ends*) entstehen. Die Enzymaktivität wird in "units" (engl.: Einheiten) angegeben. Ein Unit ist als die Menge Enzym definiert, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in 60 min vollständig zu schneiden. Die Reaktionsbedingungen und die Zusammensetzung der Reaktionspuffer unterscheiden sich von Enzym zu Enzym und wurden nach Angaben der Hersteller gewählt.

### 3.8.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet man eine Agarosematrix. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente im elektrischen Feld ist von den folgenden Parametern abhängig:

- die Mobilität eines DNA-Fragments ist im Bereich von 0,5 bis 7 kb proportional seiner molaren Masse.
- mit steigender Agarosekonzentration im Gel verlangsamt sich die Wanderungsgeschwindigkeit, die Trennschärfe kleiner Fragmente wird besser.
- bei niedriger Spannung ist die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Voltzahl und die Auftrennung optimal. Der Spannungsgradient sollte 5 V/cm Gellänge nicht überschreiten.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,5 bis 2,0 % in 0,5-fach konzentriertes TBE gewählt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5-fach konzentriertes TBE eingesetzt. Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) in den Laufpuffer und anschließender Visualisierung durch UV-Licht (254 nm).

**TBE-Puffer:** 90 mM Tris  
90 mM Borsäure  
2 mM EDTA  
mit NaOH auf pH 8,3 einstellen

Zum Abschätzen der Fragmentlänge wurde parallel ein Standard Molekulargrößenmarker aufgetragen.



### 3.8.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Vor Einklonierung eines DNA-Fragments in ein Plasmid ist es zweckmäßig, die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA zu entfernen, um eine Religation der Vektorenden zu vermeiden, wodurch es zu einer geringeren Ausbeute an rekombinanten Plasmiden käme. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn die Subklonierung mit nur einem Restriktionsenzym durchgeführt wird oder es sich um glatte Enden handelt. Eine Religation des Vektors wird durch eine 15 minütige Behandlung bei 37°C mit alkalischer Phosphatase (CIAP, *calf intestine phosphatase*, 1 u/µg DNA), unmittelbar nach Linearisierung des Vektors, verhindert. CIAP spaltet 5'-Phosphatgruppen eines DNA-Stranges hydrolytisch ab, eine Ligation kann somit nur mit einer 5'-Phosphatgruppe des Inserts erfolgen. Der dephosphorylierte Vektor wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, durch die Elektrophorese von Puffer und Enzymen gereinigt und aus dem Gel extrahiert.

### 3.8.8 Auffüllen von 5' DNA-Enden

Um zwei DNA-Fragmente, deren Enden nicht kompatibel zueinander sind, miteinander zu ligieren, ist es notwendig, diese Enden durch eine Polymerase-Reaktion mit Desoxynukleotiden zu glatten Enden aufzufüllen. Das hierfür verwendete Enzym ist das Klenow-Enzym, welches der großen Untereinheit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase I aus *E. coli* entspricht. Dieses Enzym katalysiert die Addition von Desoxynukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe eines DNA-Moleküls, das einen 5'-Überhang besitzt und somit sowohl als Primer als auch als Matrize dient. Ferner besitzt das Klenow-Enzym eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Bei dieser Reaktion wurden bis zu 10 µg DNA in mit 4 µl eines dNTP-Mixes (10 mM pro dNTP) und 10 *Units* Klenow-Enzym in einem Volumen von 30 µl für 30 min bei 37°C inkubiert.

### 3.8.9 Ligation von DNA Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen. Die Reaktion ist abhängig von  $Mg^{2+}$ -Ionen und ATP. Die Inkubation der DNA-Fragmente (nach Extraktion aus dem präparativen Agarosegel, in dem jeweils 10 µg geschnittene DNA aufgetragen wurde) erfolgte für

12-20 h bei RT. Anschließend wurden 15-30 µl des Ligationsansatzes für die Transformation der ligierten Plasmide in kompetente Bakterien eingesetzt.

**Ligationsansatz:** 20 µl Insert-DNA  
1 µl Vektor-DNA (Dephosphoryliert)  
3 µl 10X Reaktionspuffer  
1 µl T4 DNA-Ligase  
5 µl H<sub>2</sub>O

### **3.8.10 Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von RNA wurde das TriFast-Reagenz von peqlab genutzt, welches auf der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen basiert. Diese Methode ist eine Einschnitt-Flüssigphasen-Separation, mit deren Hilfe man nicht-degradierte RNA erhält. Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1-2 ml TriFast je 10 cm Schale und mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die so homogenisierten Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter TriFast wurden dann 0,2 ml Chloroform zur Probe gegeben und diese wurde für 15 sec kräftig geschüttelt. Daraufhin erfolgte eine weitere Inkubation für 3-10 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Dabei bilden sich drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Phase. Zur RNA-Präzipitation wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter TriFast versetzt. Die Probe wurde gut gemischt und die RNA durch eine 5-15 minütige Inkubation auf Eis gefällt. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 rpm. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75%-igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 min bei 4°C und 12.000 rpm) gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und schließlich in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Ein Erhitzen der Probe auf 55-60°C verbesserte die Löslichkeit.

### 3.8.11 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

RNA-abhängige DNA-Polymerasen synthetisieren DNA anhand einer RNA-Matrize. Verwendet man Gesamt-RNA eines Gewebes als Matrize und zwei spezifische Primer, so amplifiziert man die RNA des gewünschten Gens. Diese cDNA kann dann als Matrize für die spezifische Amplifikation eines exprimierten Gens durch PCR verwendet werden. RNase-Kontaminationen wurden durch Hitzesterilisation (8 h, 250°C) aller Glasgeräte und dem Benutzen von frischen Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Reaktionsgefäße) direkt aus der Verpackung verhindert. In dieser Arbeit wurde ein *One-Step-Kit* (Invitrogen) eingesetzt, bei dem in einer Reaktion, die reverse Transkription der RNA in cDNA und die darauf folgende Amplifizierung der cDNA ablaufen. Alle verwendeten Puffer und Lösungen waren RNase-frei. RNase-freies Wasser wurde durch Millipore-Filtration ( $U > 18M\Omega$ ) und anschließende Filtration durch einen hydrophoben Filter (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ ) gewonnen. Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend in der PCR-Apparatur amplifiziert:

#### Reaktionsansatz

X  $\mu\text{l}$  RNA (1 pg-1  $\mu\text{g}$ )  
 1  $\mu\text{l}$  Forward-Primer (10  $\mu\text{M}$ )  
 1  $\mu\text{l}$  Reverse-Primer (10  $\mu\text{M}$ )  
 1  $\mu\text{l}$  RT-Taq-Mix  
 25  $\mu\text{l}$  Reaktions-Mix  
 → mit H<sub>2</sub>O auf 50  $\mu\text{l}$  auffüllen

#### Reaktionsbedingungen

30 min 55°C → 2 min 94°C  
 [15 sec. 94°C → 30 sec. 55°C\* → 1 min/kb  
 68°C] X 40 Zyklen  
 60 min 72°C → 4°C ( $\infty$ )

\* Diese Temperatur muss den jeweiligen Primerpaaren angepasst werden.

Ein wichtiger Parameter bei der PCR ist die Schmelztemperatur der Primer. Sie errechnet sich für Primer mit >18 bp nach folgender Formel:

$$T_m [\text{°C}] = 81,5 - 16,6 \times (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 \times (\%GC) - (600 / N)$$

$T_m$  = Schmelztemperatur [in °C]

[Na<sup>+</sup>] = Natriumionenkonzentration im PCR-Puffer

(%GC) = prozentualer Anteil von Guanin- und Cytosin-Basen im Primer

### 3.8.12 Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl.: *polymerase chain reaction*) ist ein sehr effizientes *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Molekülen durch DNA-Polymerasen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Zunächst wird die zu vervielfältigende DNA-Matrize ("*template*") bei 94°C denaturiert. Dann erfolgt die Hybridisierung (auch Anlagerung oder "*annealing*") der Primer (kurze Oligonukleotide mit komplementärer Basenabfolge zu bestimmten Bereichen der Matrize). Die freien 3'-OH-Enden der Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase, die in Gegenwart von Nukleotiden (dNTPs) und Mg<sup>2+</sup>, diese mit dem komplementären Strang als Matrize verlängert. Die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen (wie z.B. die *Taq*-Polymerase, stabil bis 96°C) ermöglicht eine kontinuierliche Abfolge solcher Zyklen (Denaturierung→Hybridisierung→Synthese). Dadurch erreicht man eine exponentielle und selektive Amplifikation eines DNA-Moleküls.

Für die Amplifikation der verschiedenen Abschnitte wurden folgende Bedingungen verwendet:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Reaktionsbedingungen</u>
x µl DNA (1-100 ng)	
1,5 µl Forward-Primer (10µM)	2 min 94°C
1,5 µl Reverse-Primer (10µM)	[15 sec. 94°C → 30 sec. 55°C* → 1 min/kb 72°C] x 35 Zyklen
1 µl MgSO <sub>4</sub> (50mM)	60 min 72°C → 4°C (∞)
1,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM)	
5 µl Taq-Puffer (10X)	
1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)	
mit H <sub>2</sub> O auf 50 µl auffüllen	* Diese Temperatur muss den jeweiligen Primerpaaren angepasst werden.

Im Anschluss an die Reaktion wurden die so amplifizierten Fragmente mit einem DNA-Aufreinigungs-System (Wizard-Prep) von Abbauprodukten, überschüssigen Primern, freien Nukleotiden und Enzymresten befreit.

### 3.8.13 Die quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) ist eine Methode, die es möglich macht, die Menge an RNA quantitativ zu bestimmen. Somit kann eine Aktivierung oder Hemmung der Transkription analysiert werden. Für die qRT-PCR wurde in dieser Arbeit ein *One-Step*-Kit (Invitrogen) eingesetzt, das es erlaubt die reverse

Transkription der eingesetzten RNA in cDNA und die anschließende Amplifizierung der cDNA in einer Reaktion ablaufen zu lassen. Die Detektion der entstehenden DNA erfolgte über das *SYBR Green* Verfahren. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der direkt an doppelsträngige DNA bindet. Während dem Ablauf der PCR-Reaktion entstehen Fluoreszenzsignale, die proportional zur DNA Konzentration sind. Für die qRT-PCR wurde RNA aus LNCaP-Zellen eingesetzt die, wie in Kapitel 3.8.10 beschrieben, aufgereinigt wurde.

#### **Reaktionsansatz**

4,4 µl DNA (0,88 µg)  
0,2 µl Forward-Primer (10µM)  
0,2 µl Reverse-Primer (10µM)  
5 µl 2xSYBR Green Mix  
0,2 µl RT/Taq Mix  
10 µl Gesamtansatz

#### **Reaktionsbedingungen**

<u>PSA</u>	<u>β-Actin</u>
30 min 55°C → 2 min 94°C	3 min 50°C → 2 min 94°C
[15 sec. 94°C → 30 sec. 58°C	[15 sec. 95°C → 30 sec. 57°C
→ 30 sec 68°C] X 45 Zyklen	→ 30 sec 70°C] X 45 Zyklen
1 min 40°C → Ende	1 min 40°C → Ende

Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Spezifität des entstandenen Produkts erfolgte neben der Schmelzkurvenanalyse auch durch das Auftragen und sichtbar machen der Proben in einem Agarosegel.

### 3.9 Arbeiten mit Hefekulturen

#### 3.9.1 Hefestämme

In dieser Arbeit wurde mit den beiden folgenden Hefestämmen gearbeitet:

YPH250 (MATa *ade2-101° his3-Δ200 leu2-Δ1<sup>a</sup> trp1-Δ1 ura3-52*) und EJ250 (MATa *ade2-101° his3-Δ200 leu2-Δ1<sup>a</sup> trp1-Δ1 ura3-52 URA3::ARE-ADE2 (pRS/ARE-Ade2)*) (Ceraline et al., 2003)

#### 3.9.2 Wachstum und Lagerung der Hefestämme

Die Vermehrung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme erfolgte in YPD-Medium bei 30°C. Die Hefestämme wurden bei -80°C in einer 50%igen Glycerinlösung bzw. bei 4°C auf YPD-Platten gelagert.

<b>YPD-Medium:</b>
Hefeextrakt 10 g/l
Pepton 20 g/l
→ Autoklavieren
Zugabe einer sterilfiltrierten Glucoselösung: Endkonzentration von 2% (w/v)

Zur Herstellung von YPD-Platten wurde dem YPD-Medium vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar hinzugegeben.

#### 3.9.3 Die Hefetransformation

Die Transformation von mit Lithiumacetat (Zilliacus et al., 2001) behandelten Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde erstmals 1983 von Ito *et al.* publiziert (Ito et al., 1983). Diese Transformationsmethode zeichnet sich durch ihre schnelle und leichte Handhabung aus. Das Li<sup>+</sup>-Ion sorgt für eine bessere Durchlässigkeit der Zellwände. Die einzelsträngige Träger-DNA ist ebenfalls wichtig für die Transformation, wobei die Länge der DNA zur Ausbeute der Transformation direkt proportional ist. Daher eignet sich hochmolekulare DNA besser, sie darf jedoch kein „Gel“ (durch die Vernetzung) bilden und somit eine Vermischung der anderen Reagenzien verhindern. Zusätzlich wurde gezeigt, dass PEG (Polyethylenglykol), als notwendiger Bestandteil der Transformation, für eine Konzentrierung der Träger und Plasmid-DNA an der Zelloberfläche verantwortlich ist. Diese Voraussetzungen sorgen für Transformationseffizienzen von  $2,2 \times 10^7$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA.

Die Herstellung kompetenter Hefen und die sich anschließende Hefe-Transformation im kleinen Maßstab werden im Folgenden erläutert. Die Angaben für die Durchführung eines Peptidaptamer-Screens sind, falls diese von der Standardprozedur abweichen, parallel dazu in eckigen Klammern angegeben. Für die Transformationen kann sowohl Cäsiumchlorid-gereinigte DNA, als auch Mini-Präp-DNA verwendet werden. Die Verunreinigungen der zuletzt genannten DNA mit z.B. RNA stören die Transformation nicht, sondern scheinen die Effizienz sogar zu erhöhen. Mehrere Hefekolonien wurden zum Animpfen von 50 ml YPD-Medium verwendet und über Nacht bei 30°C bis zur stationären Phase hochgeschüttelt. Von dieser Vorkultur wurde ein Teil entnommen und als Inokulat einer 300 ml Hauptkultur benutzt, wobei die OD<sub>600</sub> dieser Kultur dann etwa 0,2 bis 0,3 betragen sollte. Erneutes Schütteln bei 30°C erhöhte die initiale OD<sub>600</sub> innerhalb von ca. drei Stunden auf Werte um 0,5 (+/-0,1). Dieses Stadium des Hefewachstums entspricht der logarithmischen Phase und ist der optimale Zeitpunkt, an dem die Hefezellen geerntet wurden, um sie kompetent zu machen. Die Kultur wurde auf sechs 50 ml Gefäße verteilt, die Zellen abzentrifugiert (5 min, RT, 3000 rpm, *Heraeus* RF-Zentrifuge) und nach Abschütten des Überstandes durch das Resuspendieren mit sterilem Wasser und der Vereinigung der Hefezellen in einem Gefäß (Endvolumen von 25-50 ml) gewaschen.[Im Aptamer-Screen wurde ein zusätzlicher Waschschritt durchgeführt.] Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Sediment in 1,5 [8] ml frisch hergestelltem TE/LiAc resuspendiert. 0,1 ml [alles] dieser Hefelösung wurden in bereits vorbereitete 1,5 [2x50] ml Reaktionsgefäße gegeben, in denen sich jeweils 0,1 µg [je 0,4 mg] der verschiedenen, zu transformierenden Plasmid-DNA (bei Mini-Präp-DNA werden 2 µl bis 3 µl verwendet) und 0,1 [je 2] mg denaturierte Träger-DNA (KT-DNA, welche durch 45 min Sonifizierung in Fragmentgrößen von ≤ 2 kb zerkleinert wurde) befanden. Anschließend wurde mit 0,6 [je 30] ml PEG/LiAc-Lösung überschichtet, die Ansätze gevortext und für 30 min in einem auf 30°C vorgeheizten Wasserbad inkubiert [im Hefeinkubator bei 30°C geschüttelt]. Nach dieser Zeit wurden 70 µl [je 3,5 ml] DMSO (100%) dazugegeben, durch vorsichtiges Schwenken mit den Hefen vermischt und ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min vorgenommen. Im Anschluss daran wurden die Transformationsansätze für 1-2 min auf Eis gestellt, um eine schnellere Abkühlung zu erreichen. Es folgte eine Zentrifugation (10 sec, 14000 rpm), nach welcher der Überstand durch eine Mikroliterpipette abgenommen wurde. Die in 150 µl [insgesamt 6 ml] Wasser

aufgenommenen Zellen wurden [zu je 200 µl] auf entsprechenden SD/DO-Platten gleichmäßig verteilt. Nach drei bis fünf Tagen Inkubation bei 30°C waren Hefekolonien gewachsen.

**SD-Medium:**

YNB 1,7 g/l

Ammoniumsulfat 5 g/l

100 ml der entsprechenden 10XDO-Lösung

→ Autoklavieren

Zugabe einer sterilfiltrierten Glucoselösung: Endkonzentration von 2% (w/v)

Zur Herstellung von SD-Platten wurde dem SD-Medium 20 g/l Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben

**PEG/LiAc LiAc/TE:**

PEG 3350 (50%ige Stocklösung) 40% TE-Puffer (10X Stocklösung) 1X

TE-Puffer (10X Stocklösung) 1X LiAc (10X Stocklösung) 1X

LiAc (10X Stocklösung entspricht 1M) 1X sterilfiltrieren

sterilfiltrieren

**10XDO-Lösung:**

(Die Zusammenstellung der AS muss den Anforderungen entsprechend angepasst werden!)

L-Adenin hemisulfat	200 mg/l
L-Arginin HCl	200 mg/l
L-Histidin HCl monohydrate	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Leucin	1000 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l

→ Autoklavieren

Für den Peptidaptamer-Screen wurden die Hefen auf vierfach selektiven SD/DO-Platten ausgestrichen. Diese Platten enthielten kein Uracil (selektiert auf das Vorhandensein des Reporterplasmids), kein Histidin (selektiert auf das Vorhandensein des AR-Expressionsplasmids), kein Tryptophan (selektiert auf das Vorhandensein eines Peptidaptamerplasmids) und kein Adenin (selektiert auf die Expression des Reportergens (Ade2)).



### **3.10 Eukaryotische Zellkulturen**

Für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

#### **3.10.1 Verwendete Zelllinien**

##### CV-1

Diese Zelllinie (ATCC CCL-70) (Jensen et al., 1964) stammt von Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) ab. In diesen Zellen wurden bisher keine funktionellen Kernhormonrezeptoren beschrieben. Sie weist eine fibroblastenartige Morphologie auf und wächst adhärent als Monolayer. Sie wurden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

##### LNCaP

LNCaP Prostatakrebszellen stammen aus einer Metastase im Lymphknoten und sind das Modellsystem für Hormon-abhängig wachsenden Prostatakrebs. Diese Zelllinie ist ein Derivat von LNCaP-Zellen und ist mit einem tetrazyklin-kontrollierten Transkriptions-Aktivator (tTA) stabil transfiziert. Diese Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS, 1% Pen/Strep und 1% Natriumpyruvat in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert (erhalten von A. Protopopov, (Protopopov et al., 2002).

#### **3.10.2 Lagerung und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Das Auftauen erfolgte rasch bei 37°C im Wasserbad oder bei RT. Der Inhalt der Gefrierampulle wurde dann mit 10 ml frischem Medium verdünnt und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm bei RT). Das Zellpellet wurde in dem entsprechenden Medium resuspendiert und in die Kulturschalen gegeben.

#### **3.10.3 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

Zellkulturen wurden regelmäßig umgesetzt, um sie in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Adherente Zellen wurden "trypsiniert". Dieser Vorgang fand folgendermaßen statt: Das Medium wurde abgesaugt und die Zellschicht einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung

überschichtet und solange bei 37 °C mit dieser Lösung inkubiert, bis sich die Zellen voneinander und von der Kulturschale lösten. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert und die so erhaltene Zellsuspension auf neue Kulturschalen verdünnt. Der Verdünnungsfaktor war abhängig vom Zelltyp und seiner Wachstumsgeschwindigkeit.

**PBS-Puffer:**

120 mM NaCl

28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**10 X Trypsinlösung:**

0,5 % Trypsin

5,3 mM EDTA

→ Verdünnung auf 1 X Trypsin in gepufferter Salzlösung ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>.**3.10.4 Herstellung von Aktivkohle-behandeltem FCS**

Um die Wirkung bestimmter Hormone auf den AR oder andere KHren zu untersuchen, wurde das Medium zur Kultivierung der Zellen während der entsprechenden Experimente mit Hormon-abgereichertem FCS angesetzt. So konnte dann eine definierte Menge des gewünschten Hormons hinzugefügt werden. Für die Herstellung des Hormon-abgereicherten FCS wurden zwei Protokolle verwendet:

**Aktivkohle-behandeltes FCS für CV-1-****Zellen:**

Hitzeinaktivierung für 30 min bei 56°C

25 g Aktivkohle auf 500 ml FCS → 1 h bei RT rühren

Aktivkohle für 15 min bei 4000 rpm und RT abzentrifugieren → 1x wiederholen

Filtrieren durch einen 0,8 µm Filter

Filtrieren durch einen 0,2 µm Filter

In 50 ml Aliquots bei -20°C lagern

**Aktivkohle-behandeltes FCS für LNCaPTet-****Zellen**

30 g Aktivkohle auf 500 ml FCS → 2 h bei 4°C rühren → 1x wiederholen (dazwischen Aktivkohle für 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugieren)

Aktivkohle für 45 min bei 15000 rpm in der UZ abzentrifugieren → 1x wiederholen

Filtrieren durch einen 0,8 µm Filter

Filtrieren durch einen 0,2 µm Filter

In 50 ml Aliquots bei -20°C lagern

### 3.10.5 DNA-Transfer in eukaryotische Zellen

#### 3.10.5.1 Die Calciumphosphat-Präzipitations-Methode

Es gibt viele Methoden, DNA in eukaryotische Organismen einzubringen. Eine davon ist die Calciumphosphat-Präzipitations-Methode. Die Details sind weiter unten beschrieben. Als DNA wurde über Cäsiumchlorid gereinigte Plasmid-DNA und mit dem „Marligen-Nukleinsäure-Reinigungs-System“ gewonnene DNA verwendet. Die Menge an eingesetzter DNA variierte und ist im Ergebnisteil dieser Arbeit für jeden Versuch separat angegeben.

Bei dieser Methode wird die DNA mit Calciumphosphat kopräzipitiert. Die so gebildeten Kristalle werden von den Zellen aufgenommen. Diese Methode wurde modifiziert nach Wigler (Wigler et al., 1978). CV-1- und LNCaP-Zellen wurden in dieser Arbeit transfiziert, um die Regulation von Reportergenen zu analysieren.

Einen Tag vor dem Transfer wurden die Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät, dass sie am Ende des Experiments konfluent waren. Am nächsten Tag wurden einheitliche Mengen von Plasmid-DNA (Gesamtmenge von 5,4 µg) in einem Reaktionsgefäß in H<sub>2</sub>O angesetzt. Anschließend wurde, die einer einfachen Endkonzentration entsprechende Menge einer 10X HEBS-Lösung hinzugefügt. Zum Schluss wurde, die einer 0,1M Endkonzentration entsprechende Menge einer 2M CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung dazugegeben und der Transfektionsmix sofort für 5 Sekunden gevortext. Nach einer 15-20-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben. Es erfolgte ein weiterer Tag Inkubation der Zellen im Brutschrank. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, wieder mit Medium überschichtet und einen weiteren Tag im Brutschrank inkubiert, bis sie geerntet wurden.

#### **10 X HEBS-Puffer**

137 mM NaCl  
60 mM Glucose  
200 mM HEPES  
50 mM KCl  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
mit HCl auf pH 7,2 einstellen

### 3.10.5.2 Der liposomenvermittelte DNA-Transfer (DOTAP-Transfektion)

Das Transfektionsreagenz DOTAP ist eine wässrige Liposomenformulierung von N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propanmethylsulfat. Die Liposomenvermittelte Transfektion wurde in dieser Arbeit alternativ für die schwer zu transfizierenden LNCaP-Zellen durchgeführt. Im Einzelnen wurden 2-3 Tage vor der Transfektion  $1,8 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ( $5 \times 10^5$  pro 3,5 cm Schale) ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank angezogen. Einige Stunden vor der Transfektion wurden das Kulturmedium in HEPES-, Antibiotika- und Serum-freies Medium ausgetauscht. HEPES wirkt sich nachteilig auf die Entstehung der DOTAP-DNA-Komplexe aus. Für die Präparation der DOTAP-DNA-Komplexe wurden insgesamt 7,5 µg (bzw. 2,5 µg) auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl in Medium (ohne HEPES, Antibiotika und Serum) verdünnt. In einem separaten Gefäß wurden 48 µl (16 µl) DOTAP mit ebenfalls Zusatz-freiem Medium auf ein Endvolumen von 140 µl (50 µl) verdünnt. Anschließend wurden beide Lösungen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren sanft gemischt. Das Transfektionsgemisch wurde nun für 10-15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 6-24 h unter den üblichen Kulturbedingungen, wurde das Medium von den Zellen entfernt und mit frischem Medium, jetzt wieder HEPES-, Antibiotika- und Serum-haltig, ersetzt. Für Reportergerneanalysen wurden die Zellen nach weiteren 48 h Inkubation bei 37°C geerntet. Bei der Durchführung eines *Colony Formation Assays* wurden die transfizierten Zellen wie im Kapitel 3.10.8 beschrieben weiterkultiviert.

### 3.10.6 Der Luziferase-Aktivitätstest

Der Luziferase-Aktivitätstest dient dazu, die Reportergenaktivität des Luziferase-Gens (Luc) zu messen. Sein Vorteil liegt darin, dass hierzu keine Radioaktivität benötigt wird. Dieser Enzymtest ist jedoch weniger sensitiv (verglichen mit dem CAT-Aktivitätstest) und eignet sich daher weniger, um Repression zu quantifizieren. Die Enzymaktivität der Luziferase kann durch Zugabe von Luziferin (LH<sub>2</sub>) und ATP nachgewiesen werden. Bei der hier stattfindenden Oxidation wird Licht frei, welches in einem Luminometer gemessen werden kann.

48-96 h nach Transfektion des Reporterplasmids, zusammen mit einem oder mehreren Transkriptionsfaktoren, deren Einfluss auf die Genaktivität untersucht werden sollten, wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Bei

LNCaP-Zellen wurde auf den Waschschrift verzichtet, um ein Wegwaschen der Zellen zu vermeiden. Das verbliebene PBS/Medium wurde gründlich abgesaugt. Dann wurden 400 µl Lysepuffer auf die Kulturschalen gegeben und 10 Minuten bei RT lysiert. Daraufhin wurden die Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt. Zur Aktivitätsmessung wurden 100 µl Luziferin-ATP-Lösung hinzugegeben und es erfolgte die Messung im Luminometer für 10 sec als Anzahl der Lichtblitze pro Minute.

**Lyse-Puffer**

Tris-Acetat pH 7,8	50 mM
MgAc	10 mM
EDTA	0,1 mM
Triton X-100	1 %
Glyzerin	15 %
DTT	4 mM
PMSF	0,2 mM
DTT und PMSF werden vor Gebrauch frisch zugegeben.	

**Substratlösung**

Tris-Acetat pH 7,8	50 mM
Luciferin	360 µM
ATP	1 mM
Coenzym A	400 µM

**3.10.7 Der LacZ-Test**

Der LacZ-Test wurde zur Normalisierung der Luziferase-Aktivitäten durchgeführt. Dazu wurden in jeder Transfektion gleiche Mengen an LacZ-DNA kotransfiziert. Zur Durchführung des LacZ-Tests wurden 50-100 µl des Zelllysats benutzt. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zunächst wurden 600 µl Z-Puffer in die 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Dann wurden 50-100 µl der zu messenden Probe hinzugefügt und durch Zugabe von 200 µl des Substrats (ONPG) wurde die Reaktion gestartet. Nach dem guten Durchmischen der Proben wurden diese bis zur Gelbfärbung bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der OD<sub>420</sub> führte nach dem Einsetzen der folgenden Formel zum eigentlichen LacZ-Wert.

**Z-Puffer:**

0,06 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,04 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
0,01 M	KCl
0,001 M	MgSO <sub>4</sub>
→ pH 7,0 einstellen	
0,05 M	β-Mercaptoethanol

**ONPG:**

4 mg/ml ONPG in 0,1 M KPO<sub>4</sub>-Puffer (pH7,0)

### **3.10.8 Der *Colony Formation Assay***

Zur Bestimmung der Wachstumsaktivität der Prostatakrebszelllinie LNCaP wurde der sog. *Colony Formation Assay* durchgeführt. Das Experiment erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen. Die LNCaP-Zellen wurden während des Versuchs in Medium kultiviert, welches 5% FCS (NICHT Hormon-abgereichert!) enthielt. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit einem Plasmid transfiziert, welches für das zu untersuchende Protein kodierte und gleichzeitig den transfizierten Zellen eine Hygromycinresistenz verschaffte. Für die Transfektion wurde die Liposomen-vermittelte Methode laut Kapitel 3.10.5.2 durchgeführt. Für den *Colony Formation Assay* wurde nach dem Entfernen des Transfektionsmixes das frische Medium mit den entsprechenden Hormonen versetzt. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen durch die Zugabe von 200 µg/ml Hygromycin in das Medium. Als Kontrolle für die Selektion mit Hygromycin wurden gleichzeitig zwei 10 cm Zellkulturschalen mit untransfizierten Zellen mitkultiviert. 2-3-mal die Woche wurde das Medium erneuert, bis die Selektion der transfizierten Zellen vollständig erreicht war. Nun wurden die stabil transfizierten Zellen für weitere 2-3 Tage kultiviert. Zur Auswertung des Assays wurden die entstanden Zellkolonien direkt unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die so entstandenen stabilen Zellpools wurden für weiterführende Experimente weiter kultiviert.

### **3.10.9 Wachstumskurven**

Eine Methode, um den Einfluss von verschiedenen Hormonen und Antihormonen auf das Wachstum von LNCaP-Zellen zu untersuchen, ist die Wachstumskurve. Hierzu wurden 5000 Zellen pro einem 24-well in Medium (5% FCS) ausgesät und mit den zu untersuchenden Liganden versetzt. 2-3-mal pro Woche wurden Zellen von den Schalen abtrypsiniert und ausgezählt.

### 3.11 Zur Verfügung gestellte Plasmide

<b>PLASMID</b>	<b>Quelle/Referenz</b>
<b>Reporterplasmide</b>	
pMMTV-luc	(Gast et al., 1998)
pPSA-luc	(Cleutjens et al., 1997)
p(UAS) <sub>4</sub> -tk-luc	(Goeman et al., 2005)
p(UAS) <sub>4</sub> -TATA-luc	Stephan Tenbaum
p(UAS) <sub>5</sub> -SV-luc	AG Baniahmad
pCMV-lacZ	U. Deutsch, Bad Nauheim
<b>VP16-Fusionsplasmide</b>	
pCMX-VP16	(Busch et al., 2000)
pCMX-VP16-C-SMRT	(Busch et al., 2000)
pCMX-VP16-NCORc'	(Busch et al., 2000)
<b>andere Expressionsplasmide</b>	
pCDNA3-ATG-linker	Jan Medenbach
pETE-Hyg	(Protopopov et al., 2002)
pSG5-hAR	(Gast et al., 1998)
pSG5-hAR <sub>T877A</sub>	U. Möhren, Gießen
pSG5-hAR-ΔHBD	(Dotzlaw et al., 2002)
pSG5-hAR-ΔN (505-919)	(Dotzlaw et al., 2002)
pSG5-hPR1 (B-Form)	P. Chambon, Strasburg
pSG5-hPR2 (A-Form)	P. Chambon, Strasburg
pRSV-hGRα	M. Schulz, Gießen
<b>Hefe-Vektoren</b>	
pAR <sub>wt</sub>	(Ceraline et al., 2003)
pRS/ARE-ADE2	(Ceraline et al., 2003)
pAD-TRX	Felix Hoppe-Seyler
<b>GAL-Fusionen</b>	
pAB-Gal <sub>94</sub> -linker	(Baniahmad et al., 1995)
pAB-Gal <sub>94</sub> -TRβ	(Baniahmad et al., 1992)
pAB-Gal <sub>94</sub> -RARΔAF2	(Baniahmad et al., 1995)
pAB-Gal <sub>94</sub> -SUMO	Oliver Schmidt
pAB-Gal <sub>94</sub> -SUMO1-55	Oliver Schmidt
pAB-Gal <sub>94</sub> -SUMO55-Ende	Oliver Schmidt
pAB-Gal <sub>94</sub> -SUMO <sub>G97A</sub>	Zihua Gong

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Rolle von Corepressoren in der Antihormontherapie

Da bekannt ist, dass Corepressoren die Transaktivierung des AR hemmen und der AR essentiell für die Proliferation von Prostatakrebszellen ist, sollte zunächst gezeigt werden, ob die CoR an der Hemmung des Hormon-abhängigen Wachstums beteiligt sind.

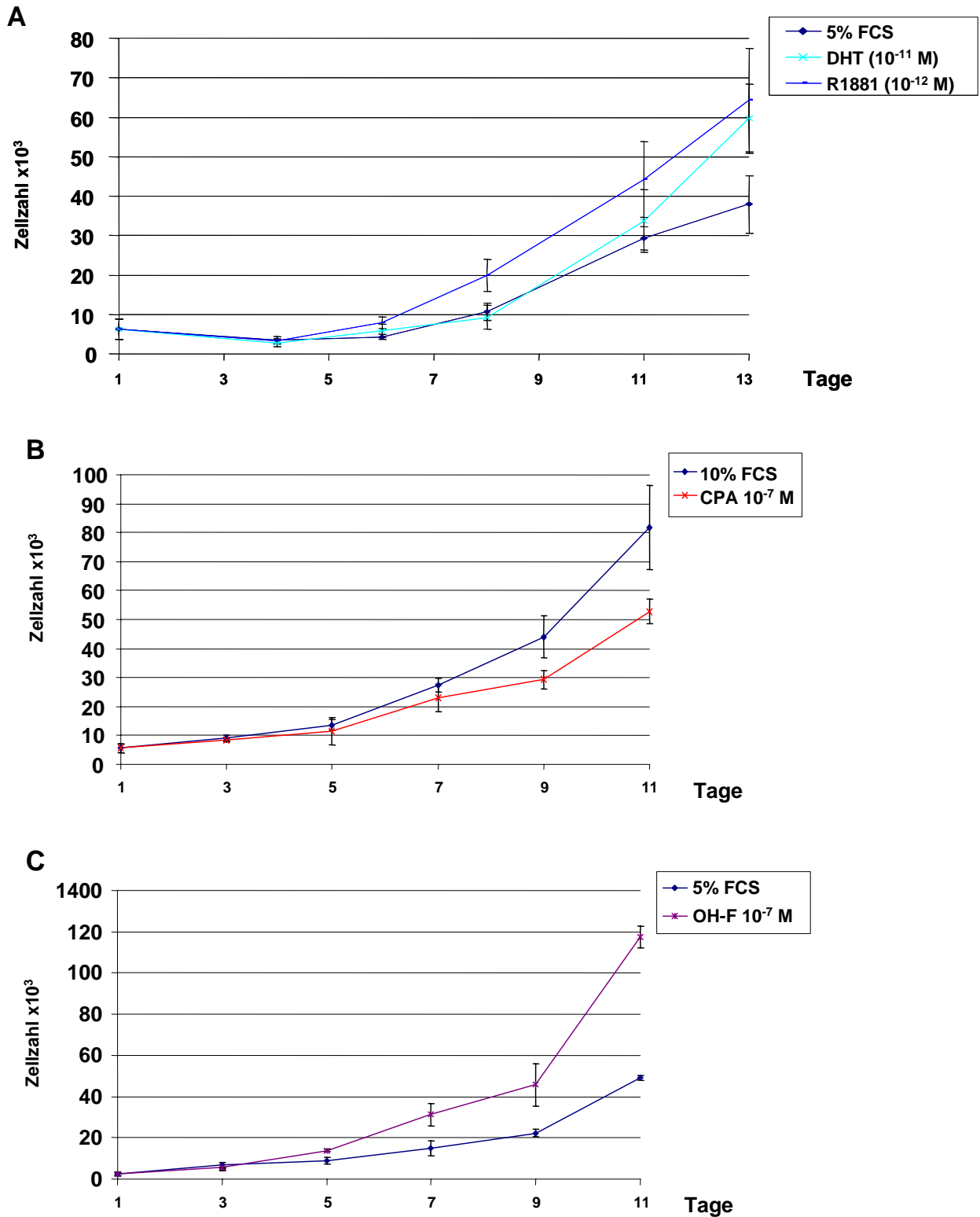
#### 4.1.1 Antihormone hemmen das Wachstum der humanen Prostatakrebszelllinie LNCaP

Es gibt verschiedene Prostatakrebszelllinien, die in den Laboren zu experimentellen Zwecken genutzt werden. LNCaP-Zellen gehören zu jenen Zellen, die sich noch im Hormon-abhängigen Stadium des Wachstums befinden und als Modellsystem für den humanen Prostatakrebs etabliert sind. Da die verschiedenen Subklone von Zelllinien durchaus unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können, musste zunächst untersucht werden, ob agonistische Liganden die Proliferation von den hier benutzten LNCaP-Zellen fördern und ob gleichzeitig antagonistische Liganden, das Wachstum dieser Zelllinie hemmen können. Einen besonderen Fall stellt in diesem Fall das Antihormon OH-F dar. Der endogene AR in diesen Zellen besitzt eine Mutation in der LBD (T877A), welche die antagonistische Wirkung von OH-F in eine agonistische umwandelt. Um die Wirkung der verschiedenen Liganden zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde eine definierte Zahl LNCaP-Zellen ausgesät und das Wachstum durch das Auszählen der Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Da LNCaP-Zellen noch ein Hormon-abhängiges Wachstum aufweisen wurden die Zellen für diese mehrtägigen Experimente in unbehandeltem FCS kultiviert, welches dann auch noch Hormone enthält, die den AR aktivieren können. Das Wachstum in Aktivkohle-bahandeltem FCS war mit dieser Zelllinie über einen längeren Zeitraum nicht möglich. Um den wachstumsfördernden Effekt von agonistischen Liganden zu analysieren wurde die FCS-Menge von 10 auf 5 % reduziert, um den AR nicht alleine schon durch das verwendete FCS vollständig zu aktivieren. Das Ergebnis zeigt, dass der synthetische Agonist R1881 bereits nach ca. 6 Tagen eine verstärkte Proliferation gegenüber den Zellen im Medium mit 5 % unbehandeltem FCS zeigt (Abbildung 4-1 A). Für den natürlichen Liganden DHT konnte nach 11 Tagen ein erhöhtes



---

Wachstum gegenüber den Kontrollzellen gezeigt werden. In einer Wachstumskurve mit dem Antihormon CPA (Abbildung 4-1 B) wurden die Zellen in Medium mit 10 % unbehandeltem FCS kultiviert, da sich die Hemmung durch diesen partiellen Agonisten nur bei einem aktivierten AR darstellen lässt. Hier zeigte sich eine Hemmung der Proliferation nach etwa 7 Tagen, die im weiteren Verlauf des Experiments noch deutlicher wurde. Im Fall des Antihormons OH-F, das für den AR<sub>T877A</sub> in LNCaP-Zellen als agonistischer Ligand beschrieben wird, konnte tatsächlich eine Aktivierung des Zellwachstums gegenüber den Zellen unter Kontrollbedingungen mit 5 % unbehandeltem FCS gezeigt werden (Abbildung 4-1 C). Bereits nach 5 Tagen zeichnete sich ein leicht verstärktes Wachstum ab, was zu den späteren Zeitpunkten noch verstärkt wurde.



**Abbildung 4-1: Die Prostatakrebszelllinie LNCaP zeigt ein Hormon-abhängiges Wachstum.** LNCaP-Zellen wurden in Medium mit unbehandeltem FCS ausgesät und zu den angegebenen Zeitpunkten ausgezählt. Tag 1 entspricht dem Tag der Hormonbehandlung. Dargestellt ist die Zellzahl  $\times 10^3$ . Der Fehler zeigt die Abweichung von Dreifachbestimmungen zum angegebenen Zeitpunkt. A) 5 % FCS ohne oder mit  $10^{-11}$  M DHT oder  $10^{-12}$  M R1881. B) 10 % FCS ohne oder mit  $10^{-7}$  M CPA. C) 5 % FCS ohne oder mit  $10^{-7}$  M OH-F.

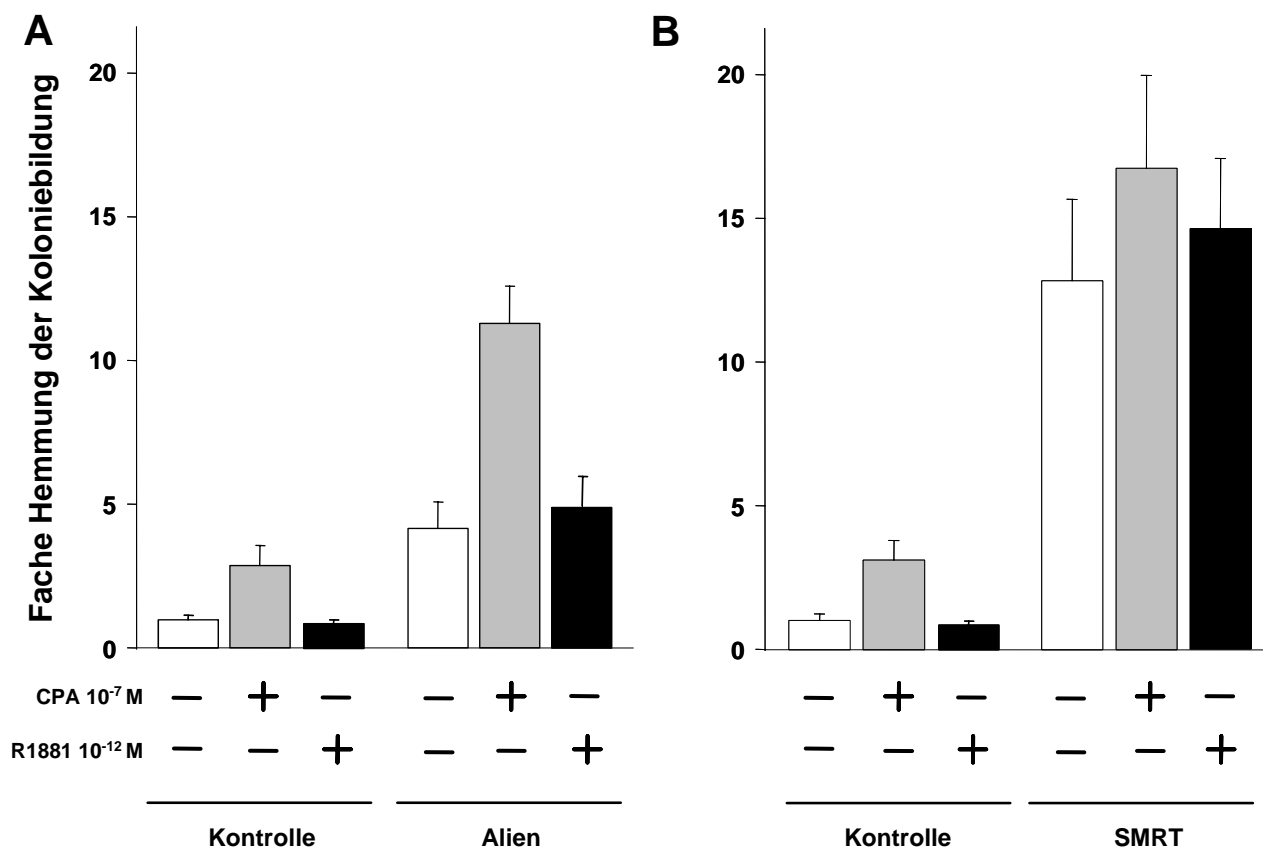
Diese Wachstumskurven zeigen, dass die hier eingesetzte LNCaP-Zelllinie ein deutliches Hormon-abhängiges Wachstum zeigt. Die Agonisten (R1881 und DHT) fördern das Wachstum, während Antagonisten (CPA) die Proliferation dieser LNCaP-Zellen hemmen. Ebenso zeigt OH-F, dass das Wachstum der LNCaP-Zellen gefördert wird. Für den Wildtyp-AR ist OH-F ein Antagonist. Für den endogen exprimierten, mutierten AR<sub>T877A</sub> der LNCaP-Zellen wirkt OH-F allerdings agonistisch, was somit anscheinend auch das Wachstum fördert. Da diese Zellen ein Hormon-abhängiges Wachstum aufweisen eignen diese sich auch für den Gebrauch in den weiterführenden Experimenten.

#### **4.1.2 Die Corepressoren Alien $\alpha$ und SMRT hemmen das Wachstum der Prostatakrebszelllinie LNCaP**

Um nun zu untersuchen, ob die CoRen Alien $\alpha$  und SMRT in der durch die Antihormone vermittelte Wachstumshemmung eine Rolle spielen, wurden *Colony Formation Assays* durchgeführt. Hierbei spiegelt die Anzahl der entstandenen Zellkolonien die Wachstumsstärke der Zellen wieder. In diesem Experiment wurden LNCaP-Zellen stabil mit Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder für Alien $\alpha$  oder SMRT kodieren. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden. Die Kultivierung der LNCaP-Zellen erfolgte in Anwesenheit von 5 % unbehandeltem FCS in Abwesenheit oder in Gegenwart des Antihormons CPA bzw. des Agonisten R1881. Die stabil transfizierten Zellen wurden durch die Behandlung der Zellen mit Hygromycin selektiert, was durch nicht-transfizierte Zellen als Kontrolle bestätigt wurde. Etwa zwei Wochen nach der Transfektion waren alle untransfizierten Zellen gestorben. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden die entstandenen Zellkolonien mikroskopisch ausgezählt.

Wie in der Wachstumskurve (Abbildung 4-1 B), zeigt sich auch bei der Anzahl der Kolonien, dass bereits die Kontroll-LNCaP-Zellen durch den Antagonisten CPA im Wachstum gehemmt werden (Abbildung 4-2 A und B). Es entstanden in Gegenwart von CPA dreifach weniger Kolonien als ohne CPA. In Anwesenheit des Agonisten R1881 wurde die Kolonienzahl kaum beeinflusst. Durch die Kultivierung der Zellen in unbehandeltem FCS sind ja bereits ohne die Zugabe von R1881 Hormone im Medium vorhanden, die den AR aktivieren. Tendenziell wurde bei der Auswertung des *Colony Formation Assays* bei den R1881 behandelten Zellen eine leicht erhöhte

Kolonienzahl beobachtet. Generell fiel beim optischen zählen der Kolonien auf, dass die Anzahl der Zellen in den einzelnen Kolonien in Gegenwart des Antagonisten CPA geringer ist. Wurde durch die stabile Transfektion  $\text{Alien}\alpha$  in den Zellen überexprimiert, so resultierte das ohne die Zugabe eines weiteren Hormons in einer vierfachen Hemmung der Koloniebildung (Abbildung 4-2 A). In Gegenwart von CPA führte Alien zu einer 12-fachen Hemmung der Koloniebildung. In Gegenwart des Agonisten wurde dessen Wachstums-fördernder Effekt aufgehoben; es kam allerdings zu keinem additiven oder synergistischen Effekt wie im Fall von CPA (Abbildung 4-2 A).



**Abbildung 4-2: Die Corepressoren Alien und SMRT verstärken die Hemmung der Proliferation von LNCaP-Zellen in Gegenwart des Antihormons CPA.** LNCaP-Zellen wurden in Medium mit 5 % unbehandeltem FCS in 10 cm Schalen ausgesät und stabil mit je 7,5  $\mu\text{g}$  der Vektoren pETE-Hyg (Kontrolle), pETE-Hyg-Alien $\alpha$  (Alien) oder pETE-Hyg-SMRT (SMRT) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hygromycin selektiert und entweder ohne Hormon oder in Gegenwart von  $10^{-7}$  M CPA oder  $10^{-12}$  M R1881 kultiviert. Nach zwei bis drei Wochen wurden die Zellkolonien gezählt. Die fache Hemmung der Koloniebildung ist gezeigt. Die Koloniezahl der Kontrolle ohne Hormon wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Der Fehler zeigt die Abweichung von Dreifachbestimmungen. A) Alien. B) SMRT.

Wurde der CoR SMRT überexprimiert, wurde die Koloniebildung bereits ohne die Zugabe von CPA oder R1881 12-fach gehemmt (Abbildung 4-2 B). In diesem Fall kam es zu keiner weiteren Erhöhung der Wachstumshemmung in der Gegenwart von CPA oder R1881. Durch die starke Reduzierung der Kolonienzahl bei der Überexpression von SMRT wäre eine weitere signifikante Hemmung in Gegenwart der beiden Liganden eventuell auch kaum nachweisbar gewesen. Ausserdem ist zu beachten, dass das verwendete Medium während des Versuchs 5 % FCS enthielt, welches nicht Aktivkohle-behandelt war. In diesem unbehandeltem FCS sind Hormone vorhanden, die die Interaktion zwischen SMRT und AR ermöglichen könnten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die starke Wachstums-hemmende Wirkung von SMRT bereits schon ohne die Zugabe von CPA oder R1881 ein Hormon-abhängiger Effekt sein könnte. Außerdem ist SMRT kein ausschließlich auf KHR wirkender CoR, was in diesem Versuch zusätzlich zu einer AR-unabhängigen Wachstumshemmung geführt haben könnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der CoRen  $\text{Alien}\alpha$  und SMRT die Proliferation der Prostatakrebszelllinie LNCaP hemmen und dass die Überexpression von  $\text{Alien}\alpha$  die Wachstums-hemmende Wirkung von CPA verstärkt. Die stabil mit  $\text{Alien}\alpha$  transfizierten Zellen wurden nach dem *Colony Formation Assay* für weitere Untersuchungen in Kultur gehalten. Aufgrund der starken Wachstumshemmung durch SMRT war eine fortführende Kultivierung der stabil mit SMRT transfizierten LNCaP-Zellen nicht möglich.

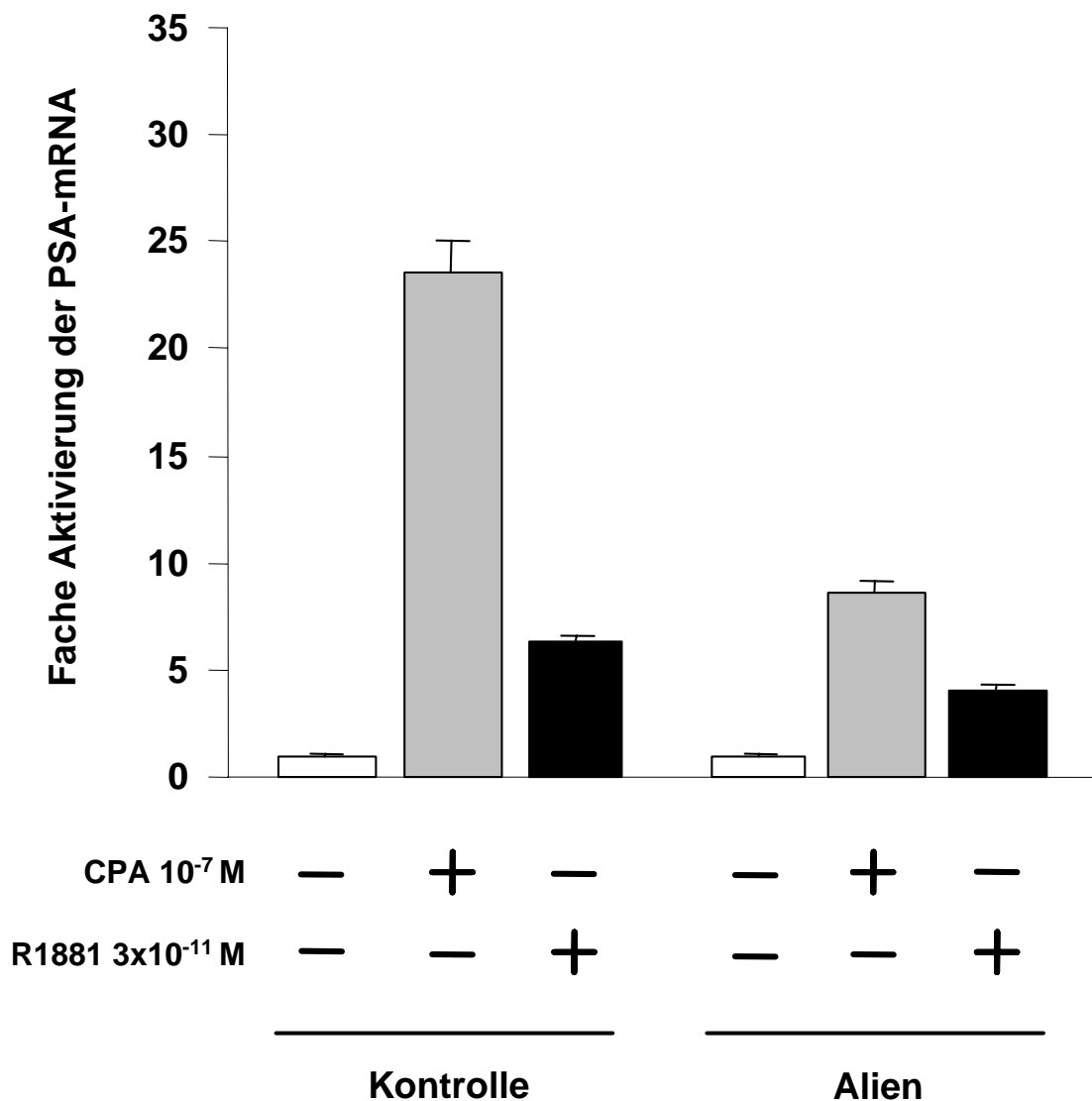
#### 4.1.2.1 *Alien $\alpha$ hemmt die Expression des Androgenrezeptor-Zielgens PSA*

Die aus dem vorangegangenen *Colony Formation Assay* resultierenden  $\text{Alien}\alpha$  überexprimierenden LNCaP-Zellen wurden für eine quantitative Analyse der endogenen PSA-Expression eingesetzt. PSA ist ein Zielgen des AR, das Androgen-abhängig exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von  $\text{Alien}\alpha$  neben der Wachstumshemmung auch zu einer Herunterregulierung des PSA-Gens führt, wurde mit RNA-Extrakten dieser Zellen eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die Menge der PSA-mRNA wurde bereits in untransfizierten LNCaP-Zellen durch die Zugabe von CPA und R1881 erhöht (Abbildung 4-3). CPA ist ein Antagonist, der nur den aktivierten AR hemmen kann. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten weist CPA eine partiell agonistische Wirkung auf,

---

da die Zellen in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS kultiviert wurden und somit der AR nicht aktiv war. In diesem Fall erhöhte CPA die Expression von PSA sogar stärker als R1881, was durch die höhere Konzentration zu erklären ist (Abbildung 4-3). Wurden höhere Mengen an R1881 eingesetzt, so stieg auch die Expression von PSA an (Daten nicht gezeigt). Da diese Ergebnisse allerdings im Bezug zu den vorher durchgeführten Experimenten stehen, wurde für die Darstellung des Ergebnisses die entsprechend geringere Konzentration des Liganden ausgewählt.

Schlussfolgernd könnte man sagen, dass es in den Alien $\alpha$  transfizierten Zellen, in Anwesenheit von R1881 zu einer geringfügigen Hemmung der PSA-Expression kam (Abbildung 4-3). Diese Hemmung könnte durch die Überexpression des CoRs erfolgt sein, welcher möglicherweise die Interaktion des AR mit den endogenen CoA auch in Gegenwart des Agonisten kompetitiert haben könnte. Ausserdem weisen die resultierenden Daten deutlich darauf hin, dass in diesen Zellen, die PSA mRNA-Menge in Gegenwart von CPA herunterreguliert ist.



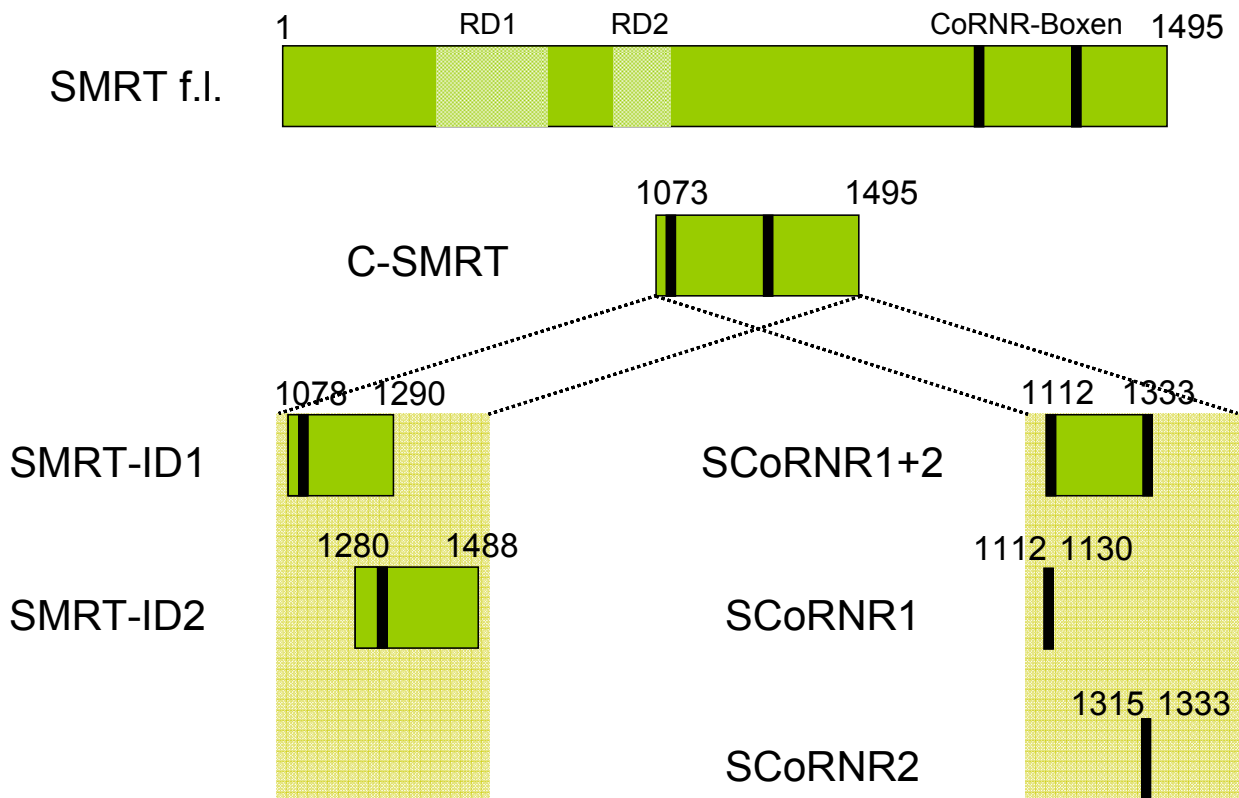
**Abbildung 4-3: Alien verstärkt die CPA-vermittelte Hemmung der endogenen PSA-Expression in LNCaP-Zellen.** LNCaP-Zellen bzw. ein stabil mit Alien $\alpha$  transfizierter LNCaP-Zellpool wurden in Medium mit Hormon-abgereichertem FCS ausgesät. 48 h später wurde das Medium durch frisches Medium ohne Hormon, mit  $10^{-7}$  M CPA oder  $3 \times 10^{-11}$  M R1881 ersetzt. Die PSA RNA-Menge wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die RNA-Menge in Abwesenheit von Hormon wurde jeweils 1 gesetzt. Das Ergebnis wurde durch die Verrechnung mit der  $\beta$ -Actin RNA-Menge normalisiert. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Ergebnisse mit der zuvor gezeigten Wachstumshemmung durch den CoR Alien $\alpha$  korrelieren. Gleichzeitig wird die Expression des AR-regulierten PSA-Gens gehemmt. Man könnte also den Schluss ziehen, dass die CoRen eine essentielle Rolle, nicht nur in der Hemmung der Transkription durch Antihormone, sondern auch in der Wachstums-hemmenden Wirkung der Antihormontherapie spielen.

## **4.2 Charakterisierung der minimalen Interaktionsdomänen von SMRT für die Interaktion mit Kernhormonrezeptoren**

Ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Antihormontherapie ist die Interaktion des ARs mit CoRen. CoRen hemmen die Aktivität des Rezeptors in Gegenwart von antagonistischen Liganden und führen zu einer Hemmung des Prostatakrebszellwachstums (Kapitel 4.1.2). Einer der Gründe für Androgen-unabhängiges Prostatakrebszellwachstum ist ein Verlust der Interaktion zwischen CoR und dem AR. Die Idee hinter diesem Projekt war nun, einen neuen CoR zu synthetisieren, der mit dem AR interagiert und diesen effektiv hemmen kann. Ein solcher CoR muss zwei Kriterien erfüllen: Er muss erstens an den AR binden und zweitens dessen Aktivität hemmen. Folglich muss zunächst ein Bindemotiv ausgewählt werden, das mit dem AR interagieren kann, welches in einem weiteren Schritt an eine potente Repressionsdomäne fusioniert wird, um dessen Aktivität zu hemmen. Es wurde bereits beschrieben, dass der CoR SMRT über seinem C-Terminus mit dem AR interagiert. In diesem C-Terminus befinden sich zwei sog. CoRNR-Boxen. Diese Domänen wurden als minimale Interaktionsmotive von SMRT mit den KHR TR und RXR und RAR (Cohen et al., 2001; Hu et al., 2001) beschrieben. Möglicherweise stellen die CoRNR-Boxen nicht die minimalen Interaktionsdomänen für den AR dar. Um die Interaktionsdomäne von SMRT mit dem AR weiter einzuschränken und so eventuell ein AR-spezifisches Interaktionsmotiv zu finden, sollte die minimale Interaktionsdomäne von SMRT mit dem AR charakterisiert werden. Hierzu wurden von dem bereits als mit dem AR-interagierenden C-Terminus (C-SMRT) weitere Deletionen hergestellt, um diese auf eine mögliche Interaktion mit dem AR zu prüfen (Abbildung 4-4). Die Konstrukte SMRTID1 und SMRTID2 umfassen jeweils etwa die Hälfte von C-SMRT und enthalten jeweils eine der sog. CoRNR-Boxen. Die Deletionen SCoRNR1 und SCoRNR2 beinhalten ausschließlich die CoRNR-Box-Motive und das Konstrukt SCoRNR1+2 beginnt mit der N-terminalen und endet mit der C-terminalen CoRNR-Box.

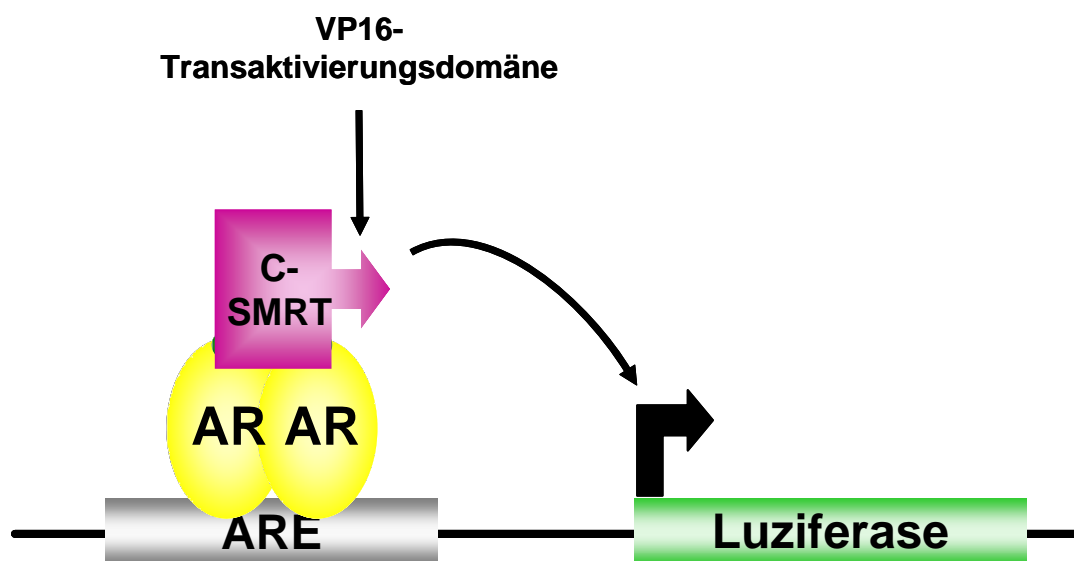




**Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der neu hergestellten Deletionen von C-SMRT.** Der 1995 von Chen und Evans identifizierte CoR SMRT besteht aus 1495 Aminosäuren (AS). SMRT enthält zwei Rpressionsdomänen im N-Terminus (RD1 und RD2). Im C-Terminus befinden sich die als CoRNR-Boxen bezeichneten Interaktionsmotive. Die Deletion C-SMRT wurde bereits als Interaktionsdomäne für den AR beschrieben (Dotzlaw et al., 2002). In dieser Arbeit wurden kleinere Deletionen von C-SMRT hergestellt, um diese auf ihre Interaktion mit dem AR zu analysieren. SMRT-ID1 umfasst die AS 1078 bis 1290 und enthält eine der CoRNR-Boxen. SMRT-ID2 umfasst die AS 1280 bis 1488 und enthält die zweite CoRNR-Box. SCoRNR1+2 enthält beide CoRNR-Boxen und umfasst die AS 1112 bis 1333. Die Deletionen SCoRNR1 und SCoRNR2 bestehen jeweils nur aus den CoRNR-Boxen (AS 1112 bis 1130 bzw. 1315 bis 1333). Die Zahlen geben die Aminosäureposition in SMRT an.

Für die Charakterisierung der Interaktion mit dem AR wurde das modifizierte Säuger Zwei-Hybrid-System durchgeführt. In diesem Versuch werden Säugerzellen transient mit verschiedenen Vektoren transfiziert. Zur Auswertung dient ein Luziferase-Reporterplasmid, dessen Expression unter der Kontrolle eines *Androgen Response Element* steht. Gleichzeitig werden die Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert, der für den unfusionierten humanen AR kodiert. Das auf seine Interaktion zu untersuchende Konstrukt wird als VP16-Fusion in die Zellen kotransfiziert. VP16 ist eine starke Aktivierungsdomäne. Interagiert nun eines der VP16-fusionierten Konstrukte mit dem AR, welcher an das ARE des Reporters bindet, so kommt es zu einer räumlichen Nähe von VP16 an den Promotor und folglich, durch die VP16-Aktivierungsdomäne, zu einer verstärkten Expression der Luziferase (Abbildung 4-5).

Die Luziferaseaktivität kann in einem Luminometer bestimmt werden (Kapitel 3.10.6). Dieses System ist eine Modifikation des klassischen Säuger-Zwei-Hybrid-Systems, in welchem auch der Rezeptor als Fusionskonstrukt in die Zellen transfiziert wird. In diesem Fall ist der jeweilige Rezeptor an eine Gal4-DBD fusioniert, die an sog. UAS (upstream activating sequence) DNA-Sequenzen binden kann. Entsprechend enthält das Reporterplasmid dann UAS-Bindestellen für die Bindung des Rezeptors. Das klassische Säuger Zwei-Hybrid-System wurde für die Experimente mit den KHRen TR und RAR eingesetzt.



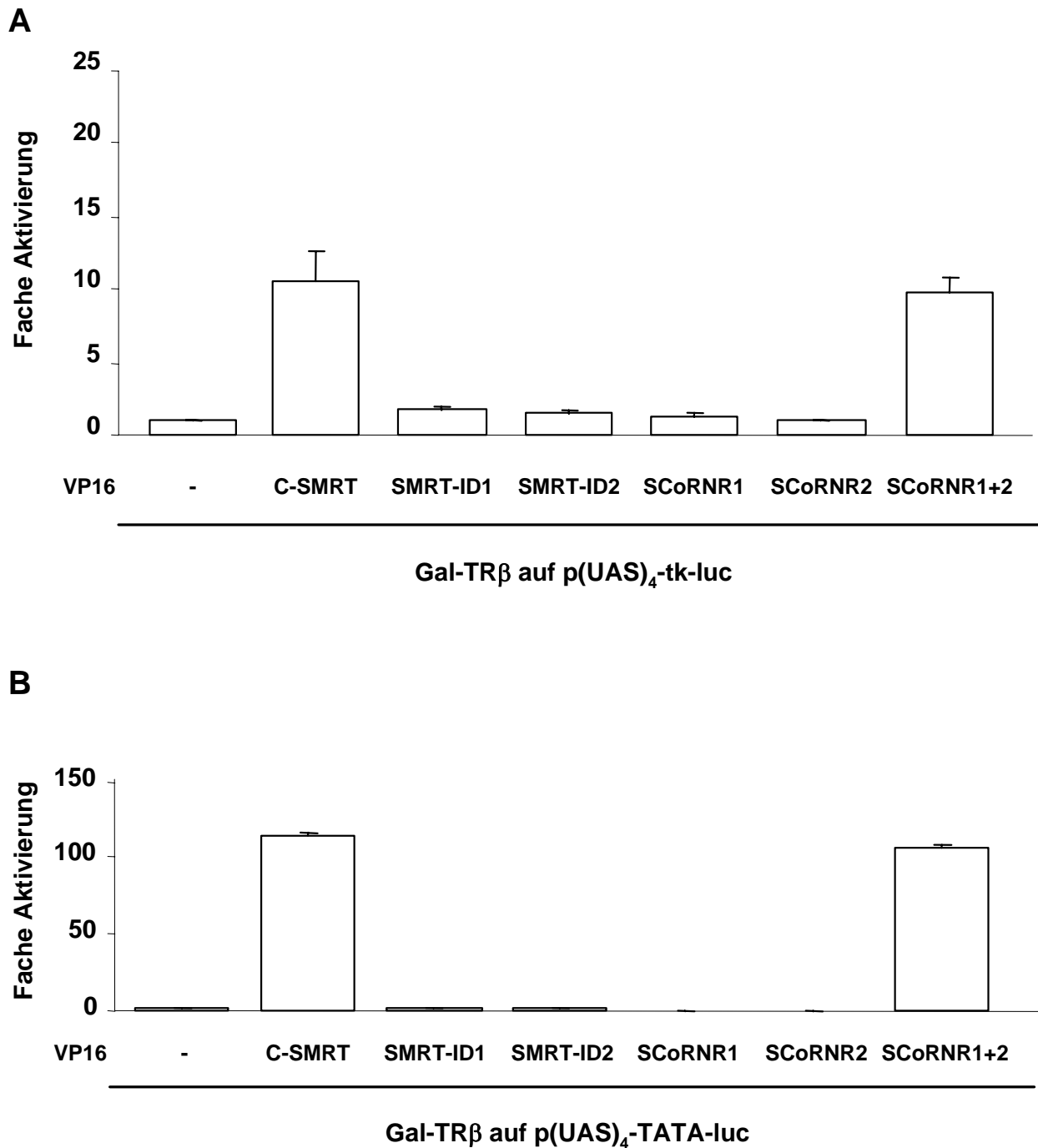
**Abbildung 4-5 Schematische Darstellung des modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System.** Beim modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System werden Säugerzellen transient mit verschiedenen Plasmiden transfiziert. Als Reporter dient die Luziferase, welche unter der Kontrolle eines *Androgen Response Element* (ARE) steht. Gleichzeitig wird ein Expressionsplasmid für den unfusionierten (daher modifiziertes Zwei-Hybrid-System) Androgenrezeptor (AR) transfiziert. Der auf seine Interaktion zu untersuchende Faktor (hier beispielhaft C-SMRT) wird fusioniert an die VP16-Transaktivierungsdomäne kotransfiziert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem AR und dem VP16-fusionierten Faktor, so wird die Expression der Luziferase verstärkt. Die Aktivität der Luziferase kann durch eine luminometrische Messung bestimmt werden.

Da für den TR und den RAR die minimalen Interaktionsdomänen von SMRT bereits beschrieben wurden (Cohen et al., 2001; Hu et al., 2001), wurden die neu klonierten Plasmide zunächst auf ihre Interaktion mit diesen beiden Rezeptoren erforscht. Hierfür fand das klassische Säuger Zwei-Hybrid-System seine Anwendung. CV-1-Zellen exprimieren keinen endogenen AR, GR, PR oder TR und eignen sich daher hervorragend für diese Interaktionsstudien.

#### 4.2.1 Die Deletion SCoRNR1+2 interagiert mit dem Thyroidhormonrezeptor

Für die Charakterisierung der Interaktion der einzelnen C-SMRT-Deletionen mit dem TR wurden CV-1-Zellen in Medium mit Aktivkohle-bahndeltem FCS ausgesät, da die Aktivkohlebehandlung auch das Thyroidhormon (T3) abreichert. Im Gegensatz zum AR, befindet sich der TR auch in Abwesenheit eines Liganden im Kern und reprimiert dort die Aktivität seiner Zielgene durch die Interaktion mit CoRen. Die Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert. Der TR wurde als Fusion mit einer Gal4-DBD exprimiert. Diese DBD bindet an die sog. *Upstream Activating Sequence* (UAS), welche in mehrfachen Kopien auf den verschiedenen Reporterplasmiden vorhanden ist. Die Interaktion wurde auf zwei verschiedenen Reporterkonstrukten analysiert. Wurden die Zellen mit Gal-TR $\beta$  und VP16-C-SMRT transfiziert, führte das zu einer starken Aktivierung der Reporterogenaktivität gegenüber der Luziferaseaktivität wenn die VP16-Transaktivierungsdomäne alleine transfiziert wurde (Abbildung 4-6 A und B). Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle zeigte nur die Deletion VP16-SCoRNR1+2 eine erhöhte Reporterogenaktivität. VP16-SCoRNR1+2 ist das Konstrukt, welches beide CoRNR-Boxen beinhaltet. Alle weiteren VP16-C-SMRT-Deletionen führten zu keiner weiteren Aktivierung der Luziferaseaktivität und somit scheint keine Interaktion mit dem TR vorzuliegen (Abbildung 4-6 A und B).

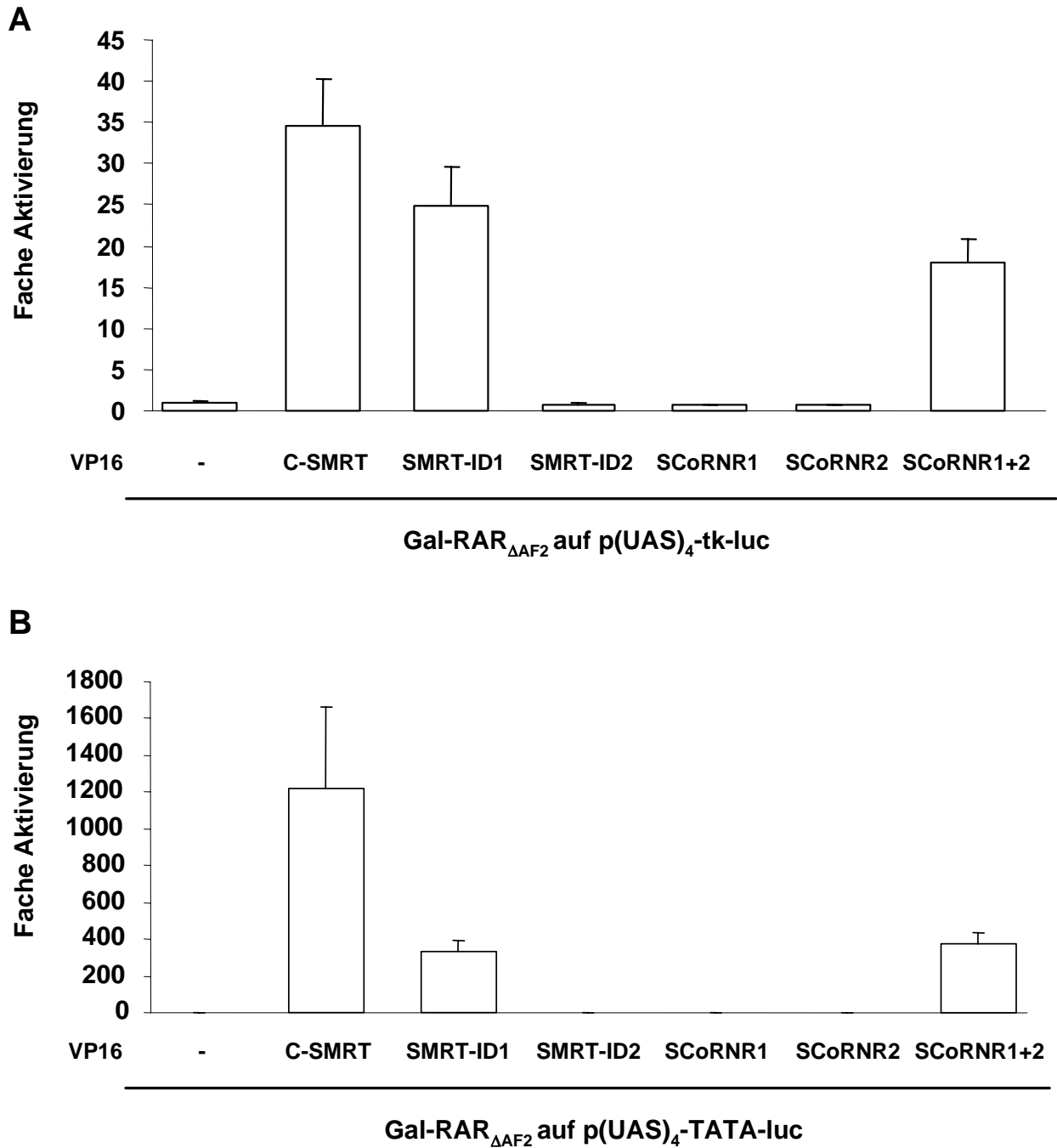
Die Reporterplasmide p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc (Abbildung 4-6 A) und p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc (Abbildung 4-6 B) zeigten dieselben Ergebnisse.



**Abbildung 4-6: VP16-SCoRNR1+2 interagiert mit TR $\beta$ .** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit jeweils 1  $\mu$ g des Luziferase-Reporterplasmids, 0,2  $\mu$ g pAB-Gal<sub>94</sub>-TR $\beta$ , 2  $\mu$ g der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2  $\mu$ g pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils 1 gesetzt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Dreifachbestimmung an. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert. A) p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc. B) p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc.

#### 4.2.2 Die Deletionen SMRT-ID1 und SCoRNR1+2 interagieren mit dem Retinsäurerezeptor

Um die Interaktion der VP16-C-SMRT-Deletionen mit Gal-RAR $_{\Delta AF2}$  darzustellen, wurden CV-1-Zellen in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS ausgesät und mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert. Gal-RAR $_{\Delta AF2}$  ist wieder eine Fusion aus Rezeptor und Gal4-DBD. Die Aktivierungsdomäne AF2 im C-Terminus des RAR wird für die Interaktion mit den CoRen nicht benötigt, welche wie beim TR in Abwesenheit von Hormon stattfindet. Auch in diesem Experiment wurde die Interaktion auf den beiden Reportern p(UAS) $_4$ -tk-luc (Abbildung 4-7 A) und p(UAS) $_4$ -TATA-luc (Abbildung 4-7 B) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion VP16-SCoRNR1+2 auch mit Gal-RAR $_{\Delta AF2}$  eine Aktivierung des Reporterplasmids zeigt und somit eine Interaktion vorzuliegen scheint. Zusätzlich führt auch VP16-SMRTID1 zu einer Aktivierung der Reportergergenaktivität, was auf eine Interaktion mit dem RAR hindeutet. Als Positivkontrolle ist die Aktivierung des Reporters durch VP16-C-SMRT gezeigt.



**Abbildung 4-7: VP16-SMRT-ID1 und VP16-SCoRNR1+2 interagieren mit dem RAR.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit jeweils 1  $\mu\text{g}$  des Luziferase-Reporterplasmids, 0,2  $\mu\text{g}$  pGal<sub>94</sub>-RAR $_{\Delta\text{AF}2}$ , 2  $\mu\text{g}$  der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2  $\mu\text{g}$  pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Dreifachbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert. A) p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc. B) p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc.

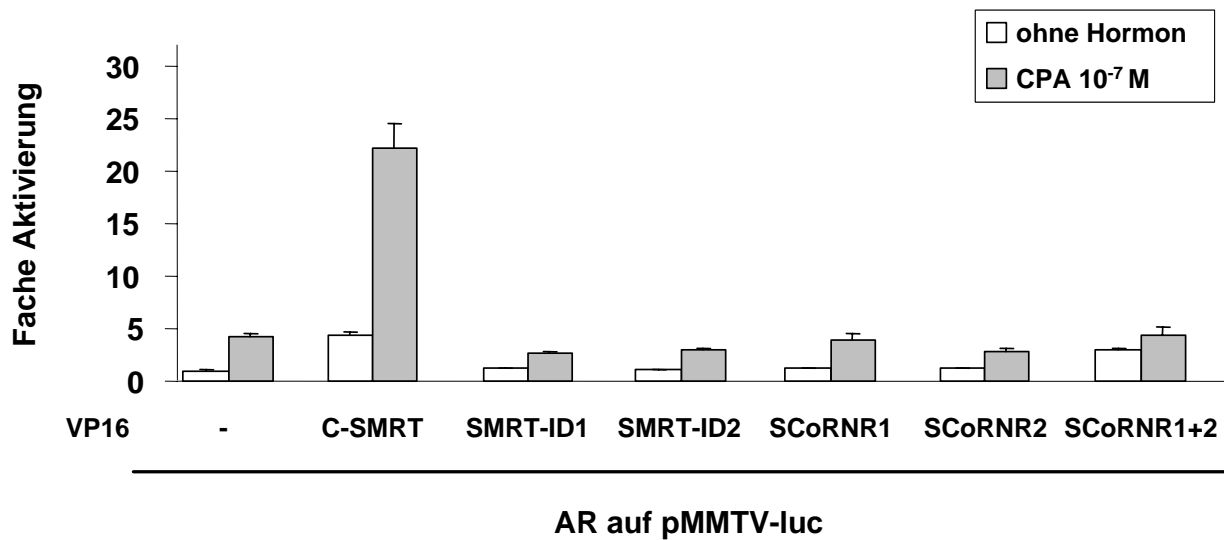
Zusammenfassend kann man festhalten, dass auch noch kleinere Fragmente der C-SMRT Deletion für eine Interaktion mit dem RAR auszureichen scheinen. Die Deletion, die beide CoRNR-Boxen enthält (VP16-SCoRNR1+2), scheint wie mit dem TR, auch mit dem RAR zu interagieren. Selbst das Vorhandensein von nur der N-

terminalen CoRNR-Box in VP16-SMRT-ID1, scheint für die Bindung von SMRT an den RAR zu genügen.

#### **4.2.3 Der vollständige C-Terminus von SMRT wird für die Interaktion mit dem Androgenrezeptor benötigt**

Nachdem die neu konstruierten C-SMRT-Fragmente auf ihre Interaktion mit TR und RAR hin untersucht wurden, war es nun interessant zu erforschen, ob eine der neu hergestellten Deletionen ebenfalls eine Interaktion mit dem AR aufweist. Zu diesem Zweck wurde das modifizierte Säuger Zwei-Hybrid-System (Abbildung 4-5) verwendet. Im Einzelnen wurden CV-1-Zellen in Medium mit Hormon-abgereichertem FCS ausgesät. Die Interaktion wurde auf dem pMMTV-luc Reporterplasmid analysiert. MMTV ist u. a. auch ein Androgen-sensitiver Promotor, der die Expression des dahinter geschalteten Luziferasegens reguliert. Wurden die Zellen mit der VP16-Transaktivierungsdomäne alleine transfiziert, so aktivierte der kotransfizierte AR den Reporter in Anwesenheit des partiellen Agonisten CPA (Abbildung 4-8). Im Vergleich zu dieser Kontrolle führte die Transfektion von VP16-C-SMRT zu einer deutlichen Aktivierung der Reporteraktivität in der Gegenwart von CPA. Auch in Abwesenheit von Hormon wurde die Reporteraktivität durch VP16-C-SMRT induziert. Diese Aktivierung kann auch AR-unabhängig sein, da VP16-C-SMRT auch mit dem Transkriptionsfaktor Oct-1 interagieren kann, für welchen sich ebenfalls Bindestellen im MMTV-Promotor befinden (Prefontaine et al., 1999). Erstaunlicherweise zeigte keines der kürzeren VP16-C-SMRT-Fragmente eine Aktivierung der Luziferasaktivität und somit lässt es den Schluss zu, dass anscheinend auch keine Interaktion mit dem AR vorliegt. Da die Deletionen VP16-SMRTID1 und VP16-SCoRNR1+2 eine Interaktion mit dem TR bzw. mit dem RAR zeigten, könnte man schlussfolgern, dass diese Domänen nicht für eine Interaktion mit dem AR ausreichen. Für die anderen Konstrukte konnten keine Positivkontrollen gezeigt werden, daher kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass diese Abschnitte nicht doch eine minimale Interaktionsdomäne für den AR darstellen könnten. Ausschließlich die Deletion VP16-SCoRNR1+2 führte zu der Hormon-unabhängigen Aktivierung des Reporters, was aber wahrscheinlich ein AR unabhängiger Effekt ist.

Man könnte also hier den Schluss ziehen, dass SMRT tatsächlich anders mit dem AR als mit TR und RAR zu interagieren scheint.



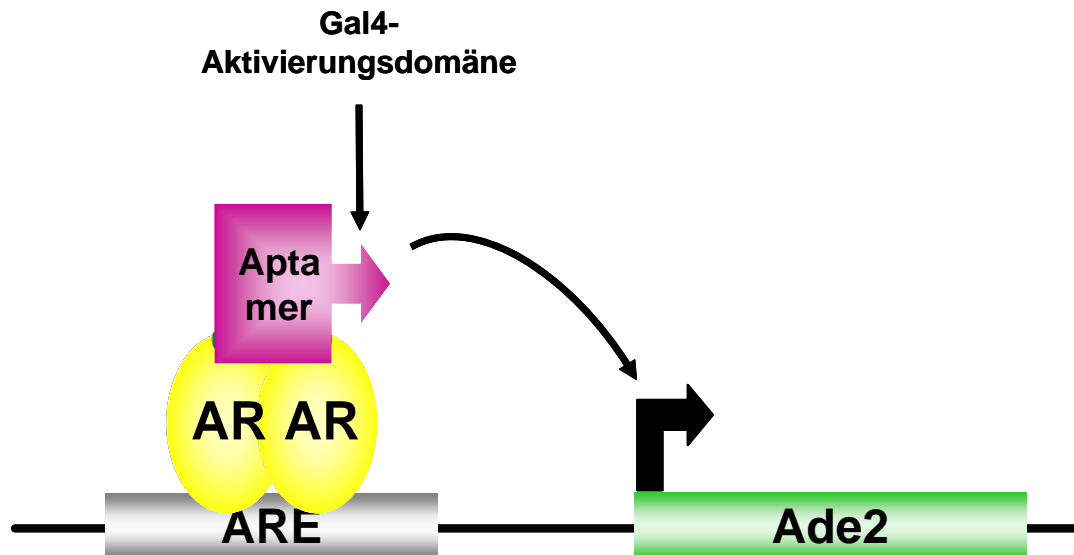
**Abbildung 4-8: Der vollständige C-Terminus von SMRT wird für die Interaktion mit dem AR benötigt.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5hAR, 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Dreifachbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

### 4.3 Die Generierung eines neuartigen Corepressors

Für die Generierung eines neuartigen CoRs, der in einer möglichen Peptidtherapie eingesetzt werden soll wäre der komplette C-Terminus von SMRT, welcher anscheinend komplett für die Interaktion mit dem AR benötigt wird, zu groß. Denn das Ziel ist ein möglichst kleines Peptid zu generieren. Dazu kommt, dass C-SMRT kein AR-spezifisches Interaktionsmotiv darstellt und daher für eine potenzielle Behandlung nicht geeignet wäre. Daher wurde für die Identifizierung eines geeigneten Bindemotivs ein neuer Ansatz gewählt. In einem dem Hefe-Zwei-Hybrid ähnlichen System besteht die Möglichkeit in Hefen, eine große Anzahl von potenziellen kleinen Peptiden zu durchsuchen. Auch für dieses Experiment wurde der unfusionierte AR eingesetzt, der in Gegenwart eines Liganden an das ARE im Promotor des Selektionsmarkers binden kann. Kommt nun eine Interaktion mit dem an eine Gal4-Aktivierungsdomäne fusionierten Peptidaptamer zustande, so wird der Selektionsmarker exprimiert, welcher das Wachstum des entsprechenden Hefeklons auf dem gemäßen Selektionsmedium erlaubt (Abbildung 4-9). Für den Screen stand



eine Peptidaptamerbibliothek in Plasmidform zur Verfügung, die theoretisch  $2 \times 10^8$  verschiedene Peptidsequenzen umfasst (Kapitel 2.4).



**Abbildung 4-9: Schematische Darstellung des Peptidaptamer-Screens in Hefen.** Beim Peptidaptamer-Screen in Hefen werden Hefen mit verschiedenen Plasmiden transformiert. Als Reporter dient das Ade2-Gen, welches unter der Kontrolle eines *Androgen Response Element* (ARE) ein Enzym exprimiert, das die Synthese von Adenin ermöglicht. Gleichzeitig wird ein Expressionsplasmid für den unfusionierten humanen Androgenrezeptor (AR) transfiziert. Dazu werden die Hefen mit der Peptidaptamer-Bank transformiert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem AR und einem der Gal4-fusionierten Peptidaptamere, so wird Ade2 exprimiert, was diesem Hefeklon das Wachstum auf Adenin-freiem Medium ermöglicht.

#### 4.3.1 Die Identifizierung eines potenten Bindemotivs für den Androgenrezeptor

Zunächst wurden für die Durchführung des Screens zwei neue Hefestämme etabliert, die stabil mit einem Reporterkonstrukt transformiert wurden. Im neuen Hefestamm Y-MMTV (*MATa ade2-101° his3-Δ200 leu2-Δ1<sup>a</sup> trp1-Δ1 ura3-52 URA3::MMTV-ADE2* (pMMTV-Ade2)) wird der Selektionsmarker Ade2 durch den Androgen-sensitiven MMTV-Promotor reguliert. Der PSA-Promotor reguliert den Selektionsmarker im neuen Hefestamm Y-PSA (*MATa ade2-101° his3-Δ200 leu2-Δ1<sup>a</sup> trp1-Δ1 ura3-52 URA3::PSA-ADE2* (pPSA-Ade2)). Zusätzlich stand ein dritter Hefestamm zur Verfügung, EJ250, dessen Selektionsmarker durch drei hintereinander geschaltete AREs des PSA-Promotors reguliert wird. Nun wurde zunächst nachgeprüft, ob die Selektionsmarker effektiv, durch den Liganden-gebundenen AR aktiviert werden können. Zu diesem Zweck wurden die Hefestämme mit einem Expressionsplasmid für den AR transformiert und auf entsprechenden Wachstumsplatten mit oder ohne

den agonistischen Liganden R1881 ausgestrichen. Ohne Hormon zeigten die Hefestämme EJ250 und Y-MMTV erwartungsgemäß kein Wachstum. In Anwesenheit von R1881 entstanden jeweils 212 bzw. 137 Kolonien (Tabelle 4-1). Das Ergebnis für den Hefestamm Y-PSA sah so aus, dass bereits ohne Hormon 224 Hefekolonien ausgezählt wurden. Mit Hormon entstanden 272 Hefekolonien. Das Ergebnis weist daraufhin, dass dieser Hefestamm kein Hormon-abhängiges Wachstum zeigt.

<u>Hefestamm</u>	<u>kein Hormon</u>	<u>R1881 10<sup>-9</sup> M</u>
EJ250	0	212
Y-MMTV	0	137
Y-PSA	224	272

**Tabelle 4-1: Aktivierung von verschiedenen Androgen-sensitiven Selektionsplasmiden in Hefen.** Die Hefestämme EJ250, Y-MMTV und Y-PSA wurden mit dem AR-Expressionsplasmid: phAR<sub>wt</sub>-His transformiert und auf 3-fach selektiven Platten ausgestrichen, die kein Uracil, kein Histidin und kein Adenin enthielten. Die Transformation der Hefen mit den Reporterplasmiden ermöglicht das Wachstum auf Uracil-defizientem Medium, die Aufnahme des AR-Expressionsplasmid ermöglichte das Wachstum auf Histidin-freiem Medium und nur wenn der AR tatsächlich den Reporter aktivierte kam es im Endeffekt zum Wachstum des Hefeklons auf zusätzlich Adenin-freiem Medium. Die transformierten Hefen wurden auf Platten ohne oder mit 10<sup>-9</sup> M R1881 ausplattiert. Die entstandenen Hefeklone wurden ausgezählt.

Da der Reporter in Y-MMTV einen natürlichen Promotor enthält, wurde er dem ebenfalls Hormon-induzierbaren Stamm EJ250 vorgezogen, dessen integrierter Selektionsmarker drei hintereinander geschaltete AREs aufweist. Aufgrund dieser Daten wurde für den Peptidaptamer-Screen der Androgen-abhängige Stamm Y-MMTV ausgewählt.

#### 4.3.1.1 Der Peptidaptamer-Screen

Da der AR in Abwesenheit von Hormon eine andere Konformation besitzt als der Liganden-gebundene Rezeptor (Kazmin et al., 2006; Kuil et al., 1995), sollten für den neuen CoR Bindemotive identifiziert werden, die mit dem Liganden-gebundenen AR interagieren. Die verschiedenen Hormone und Antihormone induzieren ebenfalls unterschiedliche Konformationen des ARs (Kazmin et al., 2006; Kuil et al., 1995). Um nun einen CoR zu entwickeln, der potentiell eine erfolgreiche Antihormontherapie

verlängern soll, wurde das bereits in der Prostatakrebstherapie verwendete Antihormon OH-F für die Durchführung des Peptidaptamer-Screens ausgewählt. Im Einzelnen wurde der Hefestamm Y-MMTV, der zuvor mit dem Expressionplasmid für den humanen AR transformiert wurde, im großen Transformationsmaßstab (Kapitel 3.9.3) mit 400 µg der Peptidaptamerbibliothek transformiert. Die transformierten Hefen wurden auf 15 cm Wachstumsplatten mit  $10^{-7}$  M OH-F ausplattiert, die die Transformanden auf vier Eigenschaften hin selektierten: das Reporterkonstrukt (Uracil), den AR (Histidin), die Peptidaptamerbibliothek (Tryptophan) und die Expression des Selektionsmarkers, der infolge einer Interaktion zwischen Peptidaptamer und AR exprimiert wird (Adenin). Um Unterschiede in der Ausbeute von Peptidaptameren in Gegenwart verschiedener Liganden zu suchen, wurde ein Teil der transformierten Hefen auf selektiven 10 cm Wachstumsplatten mit den folgenden Substanzen ausplattiert:  $10^{-7}$  M OH-F, kein Hormon,  $10^{-7}$  M CPA,  $10^{-8}$  M DHT,  $10^{-9}$  M R1881 oder  $10^{-7}$  M Cas). Als Kontrolle wurden im kleinen Maßstab mit dem AR-transformierte Y-MMTV-Hefen mit einem Kontrollvektor transformiert, welcher keine Aptamersequenz enthielt. Parallel dazu wurde die Transformationseffizienz des Peptidaptamer-Screens und der Kontrolltransformation bestimmt. Hierzu wurden die Transformanden nicht auf die Expression des Selektionsmarkers Adenin hin selektiert, welcher nur nach einer Interaktion von AR und Peptidaptamer exprimiert wird. Pro µg DNA entstanden 6885 Kolonien bei der Transformation mit der Peptidaptamerbibliothek. Das entspricht  $2,75 \times 10^6$  Kolonien gerechnet auf die eingesetzten 400 µg und deckt die theoretische Kapazität der Peptidaptamerbibliothek von  $2 \times 10^8$  verschiedenen Sequenzen nur teilweise ab. In der Kontrolltransformation ergaben sich 58400 Kolonien pro µg DNA (Tabelle 4-2). Die Effizienz dieser Kontrolltransformation war deutlich höher, da hierfür keine aufgereinigte DNA eingesetzt wurde, welche allerdings von den Hefen präferentiell aufgenommen wird.

	<b><u>Kontrolle</u></b>	<b><u>Peptidaptamer-Bibliothek</u></b>
cfu/ $\mu$ g DNA (Selektion -UHT)	<b>58400</b> Kolonien	<b>6885</b> Kolonien
cfu/400 $\mu$ g DNA (Selektion -UHT)	<b>(2,33x10<sup>7</sup>)</b> Kolonien	<b>2,75x10<sup>6</sup></b> Kolonien

**Tabelle 4-2: Transformationseffizienz des Peptidaptamer-Screens in Y-MMTV.** Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurden die transformierten Hefen auf 3-fach selektiven Platten ausplattiert. Hier entstanden Kolonien aus den Hefeklonen, welche gleichzeitig das Selektionsplasmid (Uracil, U), den AR-Expressionsvektor (Histidin, H) und ein Kontrollplasmid ohne Peptidaptamersequenz (Kontrolle; Tryptophan, T) oder ein Peptidaptamerplasmid (Peptidaptamer-Bibliothek; Tryptophan, T) enthielten. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurde die Anzahl der Kolonien ausgezählt und einmal pro  $\mu$ g oder pro der eingesetzten 400  $\mu$ g berechnet. Cfu: Kolonie-formierende Einheit.

Der große Peptidaptamer-Screen ergab insgesamt 3700 Kolonien, die in Gegenwart von  $10^{-7}$  M OH-F auf zusammen dreißig 15 cm Schalen wuchsen (Tabelle 4-3). Im Vergleich der verschiedenen Liganden entstanden auf der Wachstumsplatte ohne Hormon 120 Kolonien, die auf eine AR-unabhängige Aktivierung des MMTV-Promotors durch die Peptidaptamere hindeuten. Auf der Schale mit OH-F, CPA und R1881 ergaben sich 560, 600 bzw. 432 Kolonien (Tabelle 4-3). Bezieht man hier die 120 Liganden-unabhängig entstandenen Kolonien ein, so muss man bei etwa 20 % der identifizierten Peptidaptamere damit rechnen, dass diese zwar den MMTV-Promotor aktivieren, was aber wahrscheinlich nicht auf eine Interaktion mit dem AR hindeutet. Im Fall von DHT und Cas war die Ausbeute mit 24 bzw. 80 Kolonien vergleichsweise gering. Die Eigenschaften dieser beiden Hormone in Hefen könnten möglicherweise von ihrer Wirkung in Säugerzellen abweichen. Es ist unbekannt, wie und ob diese Hormone in Hefen aufgenommen werden bzw. ob diese eventuell in Hefen schnell abgebaut werden. Ihr Einsatz in weiteren Experimenten in Hefen sollte daher kritisch betrachtet werden.

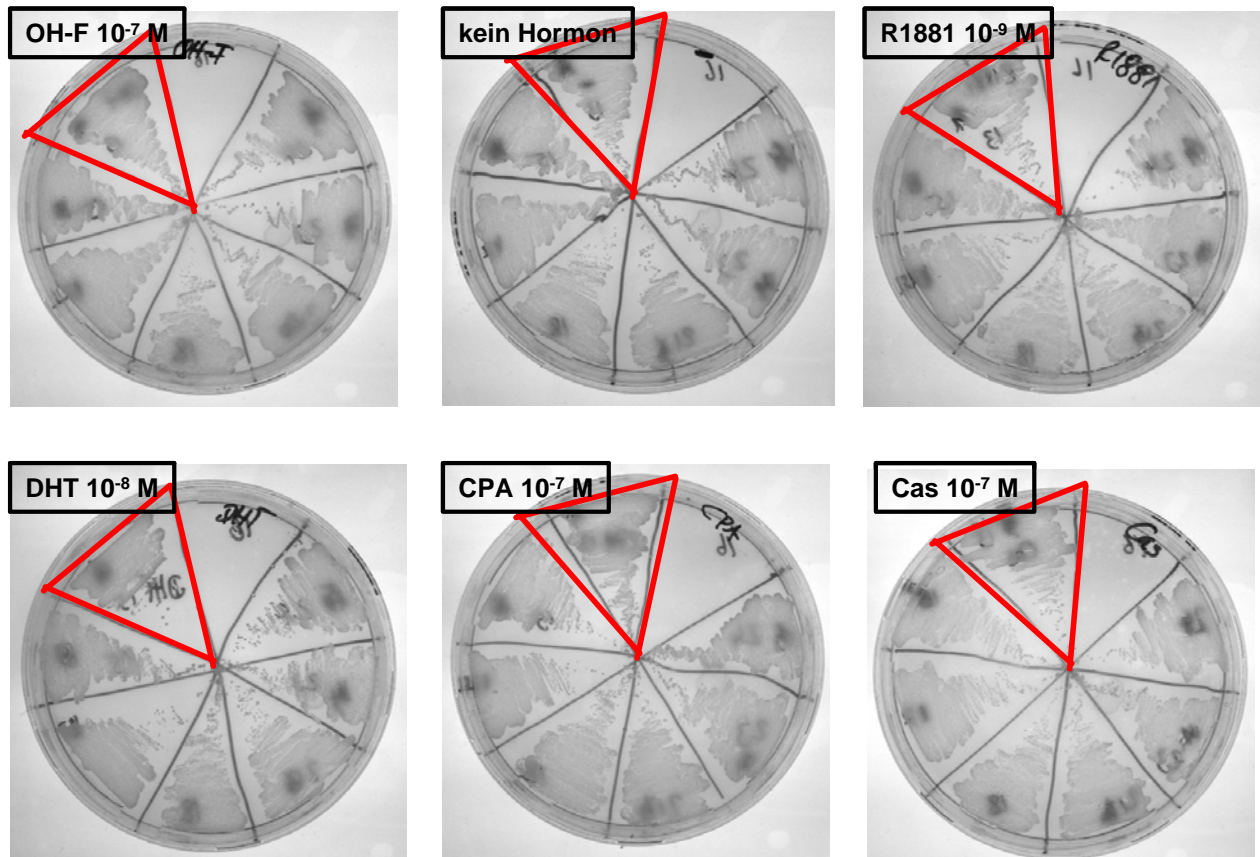
	<b><u>Kontrolle</u></b>	<b><u>Peptidaptamer-Bibliothek</u></b>
OH-F 10 <sup>-7</sup> M (30 Schalen) (Selektion –UHTA)	-	<b>3700</b> Kolonien
OH-F 10 <sup>-7</sup> M (Selektion –UHTA)	<b>2</b> Kolonien	<b>560</b> Kolonien
kein Hormon (Selektion –UHTA)	<b>0</b> Kolonien	<b>120</b> Kolonien
CPA 10 <sup>-7</sup> M (Selektion –UHTA)	<b>1</b> Kolonie	<b>600</b> Kolonien
R1881 10 <sup>-9</sup> M (Selektion –UHTA)	<b>1</b> Kolonie	<b>432</b> Kolonien
DHT 10 <sup>-8</sup> M (Selektion –UHTA)	<b>2</b> Kolonien	<b>24</b> Kolonien
Casodex 10 <sup>-7</sup> M (Selektion –UHTA)	<b>2</b> Kolonien	<b>80</b> Kolonien

**Tabelle 4-3: Ergebnisse des Peptidaptamer-Screens in Y-MMTV.** Die transformierten Hefen wurden auf 4-fach selektiven Platten ausplattiert. Hier entstanden Kolonien aus den Hefeklonen, welche gleichzeitig das Selektionsplasmid (Uracil, U), den AR-Expressionsvektor (Histidin, H), ein Kontrollplasmid ohne Peptidaptamersequenz (Kontrolle; Tryptophan, T) oder ein Peptidaptamerplasmid (Peptidaptamer-Bibliothek; Tryptophan, T) enthielten und wenn durch eine potenzielle Interaktion zwischen AR und Peptidaptamer der Selektionsmarker (Adenin, A) exprimiert wurde. Die Anzahl der entstandenen Hefeklone in Gegenwart von verschiedenen Liganden ist dargestellt.

Wie erwähnt nimmt der AR je nach gebundenem Liganden unterschiedliche Konformationen ein.

Um zu analysieren, ob die in Gegenwart von OH-F gefundenen Peptidaptamere spezifisch mit dem OH-F gebundenen AR interagieren, wurden die isolierten Hefeklone auf Wachstumsplatten (mit vierfacher Selektion) mit den verschiedenen Liganden erneut ausplattiert und die Stärke ihres Wachstums erfasst. Es war gut zu erkennen, dass die verschiedenen Hefeklone sich auf allen Wachstumsplatten vermehren konnten. Bei genauerem Betrachten konnte dennoch für manche Klone ein leichter Wachstumsvorteil auf OH-F-haltigen Platten beobachtet werden. Als ein Beispiel ist hier der rot-umrandete Hefeklon hervorgehoben (Abbildung 4-10). Dieser Klon zeigt das stärkste Wachstum auf Platten mit OH-F. In Gegenwart von R1881, CPA, Casodex oder ohne Hormon war das Wachstum geringfügig schwächer, was

besonders zur Mitte der Platte hin zu erkennen ist. In Anwesenheit von DHT war das Wachstum dieses Klon deutlich schwächer.



**Abbildung 4-10: Die Peptidaptamere zeigen ein Hormon-abhängiges Wachstum.** Die nach dem Peptidaptamer-Screen von den OH-F-Platten selektierten Klone wurden auf Wachstumsplatten in Gegenwart von verschiedenen Liganden von aussen nach innen ausgestrichen. Das hier gezeigte Beispiel (rot eingerahmt) zeigt das Wachstum des Peptidaptamers 513.

Anhand dieser leichten Wachstumsunterschiede wurden zehn Klone ausgewählt. Die DNA der Peptidaptamere wurde isoliert und anschließend sequenziert. In Tabelle 4-4 sind die Aminosäure (AS)-Abfolgen der ausgewählten Peptidaptamere aufgeführt. Die unterschiedlichen Klone wurden mit Nummern betitelt. Als erstes fällt hier auf, dass nur ein Teil der Peptidaptamere tatsächlich aus genau 20 AS besteht. Eine höhere Anzahl an AS ist durch die Integration von zwei Peptidaptameren in das TrxA-Gen zu erklären. Kürzere Sequenzen sind auf das Auftreten eines Stop-Codons zurückzuführen. Außergewöhnlich erscheint zudem, dass die Hälfte der identifizierten Peptidaptamere, statt in den C-Terminus von TrxA überzugehen, mit einem frühzeitigen Stop-Codon endet. Bei der Synthese der Peptidaptamerbibliothek wurde durch die Verwendung sog. NNK-Triplets (N= G, A, T oder C und K= G oder C) die Entstehung von zwei der möglichen drei Stop-Codons verhindert. Dass trotzdem 50

% der isolierten Sequenzen vorzeitig enden, könnte womöglich einen Vorteil für die Interaktion des Peptidaptamers mit dem AR darstellen.

### **Aminosäuresequenzen der identifizierten Peptidaptamere**

**502**: TRX-RFLVYWTVVVCVWIYPPVPQGPRFLRIGRF-STOP

**504**: TRX-AVMALPAIHSIFQLPCRPPR-TRX

**513**: TRX-PCRSDAVWVSFSLVYCCAAVGPRFNCRLCSLLQRRFCL-STOP

**517**: TRX-PLSSLCLTFLSVAV-STOP

**524**: TRX-GAPRPTVNMGLFFRETSPQSGPGITGAIGSWLHSIRKL-STOP

**530A**: TRX-SQAAPGCWARPRHGCVTRVN-TRX

**533**: TRX-NRFINGAVWLLRVVLPPSF-TRX

**536**: TRX-YVVHTRVPPGFEYELTRLFT-TRX

**537**: TRX-YVPSSLAVFLALNLVWGAVSGPASFASSLEGAAGVSDVWAV-TRX

**553**: TRX-HA-STOP

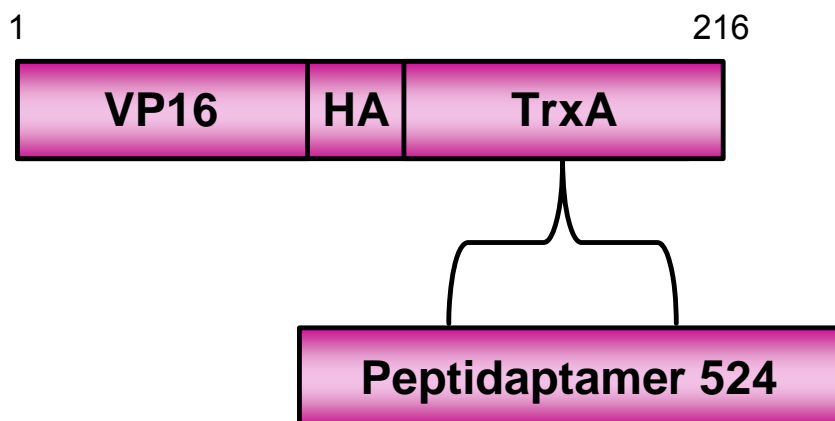
**Tabelle 4-4:** Die Tabelle zeigt die AS-Sequenzen der nach der Analyse des Hormon-abhängigen Wachstums ausgewählten Peptidaptamerklone. TRX: Thioredoxin A, STOP: zufällig entstandenes Stopp-Codon → bei diesen Peptidaptameren wird der C-terminale Teil von TrxA nicht mehr exprimiert. Die Peptidaptamere sind mit Nummern betitelt worden.

Über eine Datenbanksuche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurde anhand der DNA- und der AS-Abfolgen nach homologen Motiven in bekannten Proteinen gesucht. Für keines der aufgeführten Peptidaptamere konnten interessanterweise solche verwandten Sequenzen gefunden werden.

In dem hier durchgeführten Peptidaptamer-Screen in Hefe wurden also kurze, neuartige Sequenzen isoliert, die vermutlich Hormon-abhängig mit dem AR interagieren. Für die weitere Prüfung hinsichtlich der Eignung dieser Peptidaptamere als Bindemotive in neuartigen CoRen, musste als nächstes deren Interaktion mit dem AR in Säugerzellen dargestellt werden.

#### 4.3.1.2 Darstellung der spezifischen Interaktion zwischen den neu gefundenen Peptidaptameren mit dem Androgenrezeptor in Säugerzellen

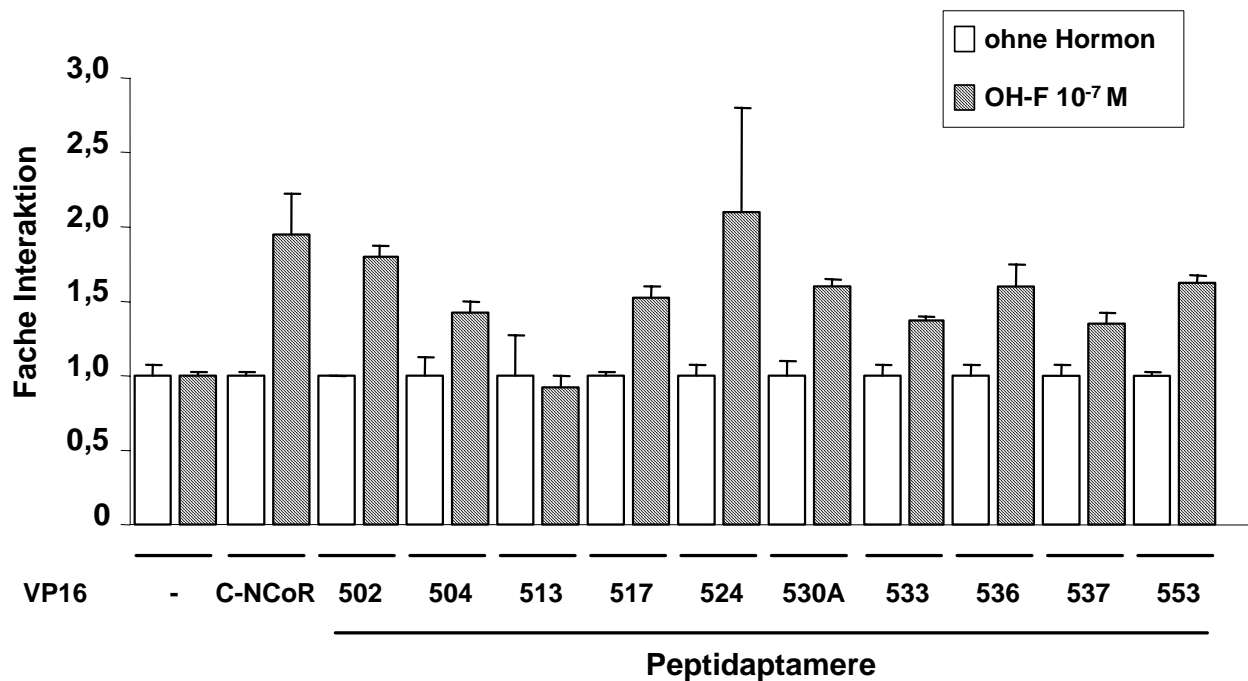
Für die Beschreibung der Interaktion zwischen den neu identifizierten Peptidaptameren und dem AR in Säugerzellen wurde wiederum das modifizierte Säuger Zwei-Hybrid-System (Abbildung 4-5) genutzt. Als Erstes war von Interesse, ob die in Gegenwart von OH-F in Hefen interagierenden Peptidaptamere, auch in Säugerzellen an den OH-F-gebundenen Rezeptor binden können. Im Hefe-Screen stand die Expression des Selektionsmarkers unter der Kontrolle des MMTV-Promotors, also wurden die CV-1-Zellen mit einem MMTV-regulierten Reporterplasmid (pMMTV-luc) transfiziert. Gleichzeitig erfolgte die Kotransfektion der Zellen mit dem humanen AR und den nun an die VP16-Transaktivierungsdomäne fusionierten Peptidaptameren (Abbildung 4-11). Der Vektor pCMX-VP16 ist ein Säuger-Expressionsvektor, welcher für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen eingesetzt wird. Die VP16-Peptidaptamere umfassen ca. 216 AS. Die Größe weicht ab, wenn mehrere Oligonucleotide eingebaut wurden oder durch ein zufälliges Stopp-Codon, der C-Terminus von TrxA nicht mehr exprimiert wird.



**Abbildung 4-11: Schematische Darstellung eines exprimierten VP16-Peptidaptamers.** Für die Experimente in Säugerzellen wurde die Peptidaptamersequenz (inklusive HA-Epitop) in den pCMX-VP16-Säugerexpressionsvektor umklontiert. VP16 ist eine starke Transaktivierungsdomäne. Die Zahlen geben die AS-Positionen an.

Als Kontrolle wurde die VP16-Transaktivierungsdomäne alleine eingesetzt. Den Vergleich für eine positive Interaktion stellte der an VP16 fusionierte C-Terminus des CoRs NCoR (VP16-C-NCoR) dar. Die VP16-C-NCoR-Fusion hat im Vergleich zu den VP16-Peptidaptameren eine Größe von 944 AS. Die Zellen wurden entweder ohne Hormon oder mit  $10^{-7}$  M OH-F kultiviert.



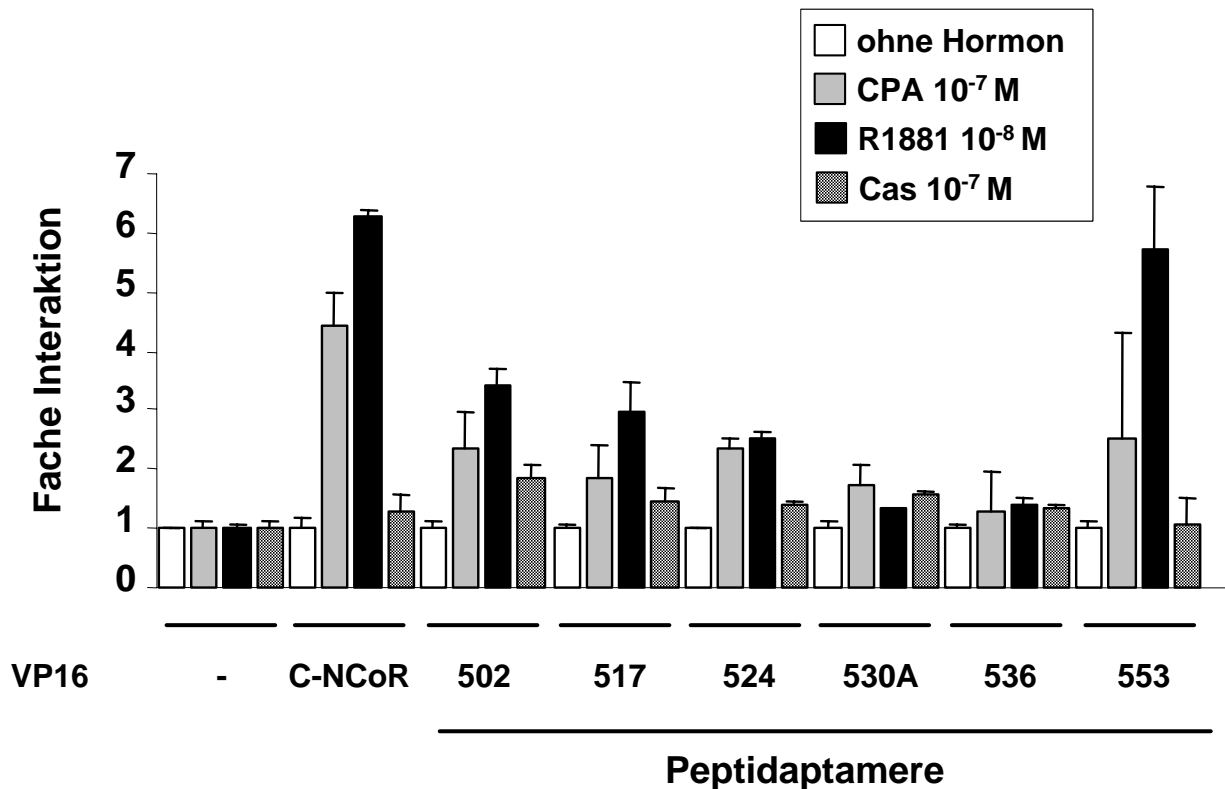


**Abbildung 4-12: Die Peptidaptamere interagieren in Gegenwart von OH-F mit dem AR in Säugerzellen.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5hAR, 2 µg der pCMX-VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt kein Hormon oder 10<sup>-7</sup> M OH-F. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität ohne Hormon wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Eine Luziferaseaktivität über 1 wurde hier als „Fache Interaktion“ dargestellt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

Die Aktivierung des Reporters durch die Positivkontrolle VP16-C-NCoR berechnet sich im Vergleich zu VP16 alleine als eine ca. zweifache Interaktion mit dem AR in Gegenwart von OH-F (Abbildung 4-12). Eine anderthalb- bis zweifache Interaktion ergab sich durch die Aktivierung der Luziferaseaktivität mit dem Antihormon-gebundenen AR auch durch die Konstrukte VP16-502, -517, -524, -530A, -536 und -553. Eine etwas schwächere Aktivierung des Reportergens erfolgte durch VP16-504, -533 und -537. Das Peptidaptamer 513 zeigte in diesem Versuch keine Aktivierung des Reporters und daher anscheinend auch keine Interaktion mit dem AR.

Um die Selektivität dieser Interaktion für OH-F als Liganden des AR zu untersuchen wurde in CV-1-Zellen die Interaktion der unterschiedlichen Peptidaptamere in Gegenwart des Agonisten R1881 oder der Antihormone CPA oder Cas untersucht. Diese Experimente wurden wieder mit dem Reporter pMMTV-luc durchgeführt. Als Kontrolle diente die VP16-Transaktivierungsdomäne alleine, deren relative Reportergergenaktivierung in Gegenwart der verschiedenen Liganden jeweils gleich

eins gesetzt wurde (Abbildung 4-13). Eine Luziferaseaktivität über eins wurde hier als „Fache Interaktion“ dargestellt. VP16-C-NCoR resultierte als Positivkontrolle in einer Reporterogenaktivierung die im Vergleich dazu als eine viereinhalb-fache Interaktion in den CPA-behandelten Zellen dargestellt ist. In den R1881-behandelten Zellen wird auf Grund der Luziferaseaktivität eine etwa sechseinhalb-fache Interaktion mit VP16-C-NCoR errechnet. Eine etwa zwei- bis zweieinhalb-fache Interaktion mit dem AR in Gegenwart von CPA scheinen auch VP16-502, -524, und -553 durch die Aktivierung der Luziferaseaktivität zu zeigen. Als ebenso stark wurde die Interaktion von VP16-524 mit dem AR in R1881-behandelten Zellen ermittelt. Weniger deutlich war die Aktivierung des Reporters und damit die scheinbare Interaktion von VP16-517 und -530A in Anwesenheit von CPA. Etwas stärker (drei- bis dreieinhalb-fach) war die anscheinende Interaktion von VP16-502 und -517 in Gegenwart des Agonisten R1881. VP16-530A zeigte keine Aktivierung des Reporters und somit anscheinend keine Interaktion mit dem AR zusammen mit R1881. VP16-536 wies weder mit dem CPA- noch mit dem R1881-gebundenen AR eine Aktivierung und damit vermutlich auch keine Interaktion auf. Keines der VP-16-Peptidaptamere zeigte einen deutlichen Effekt auf die Luziferaseaktivität wenn die Zellen mit dem Antihormon Cas behandelt wurden. Also scheint in Gegenwart von Cas auch keine Interaktion der VP16-Peptidaptamere mit dem Rezeptor vorzuliegen.

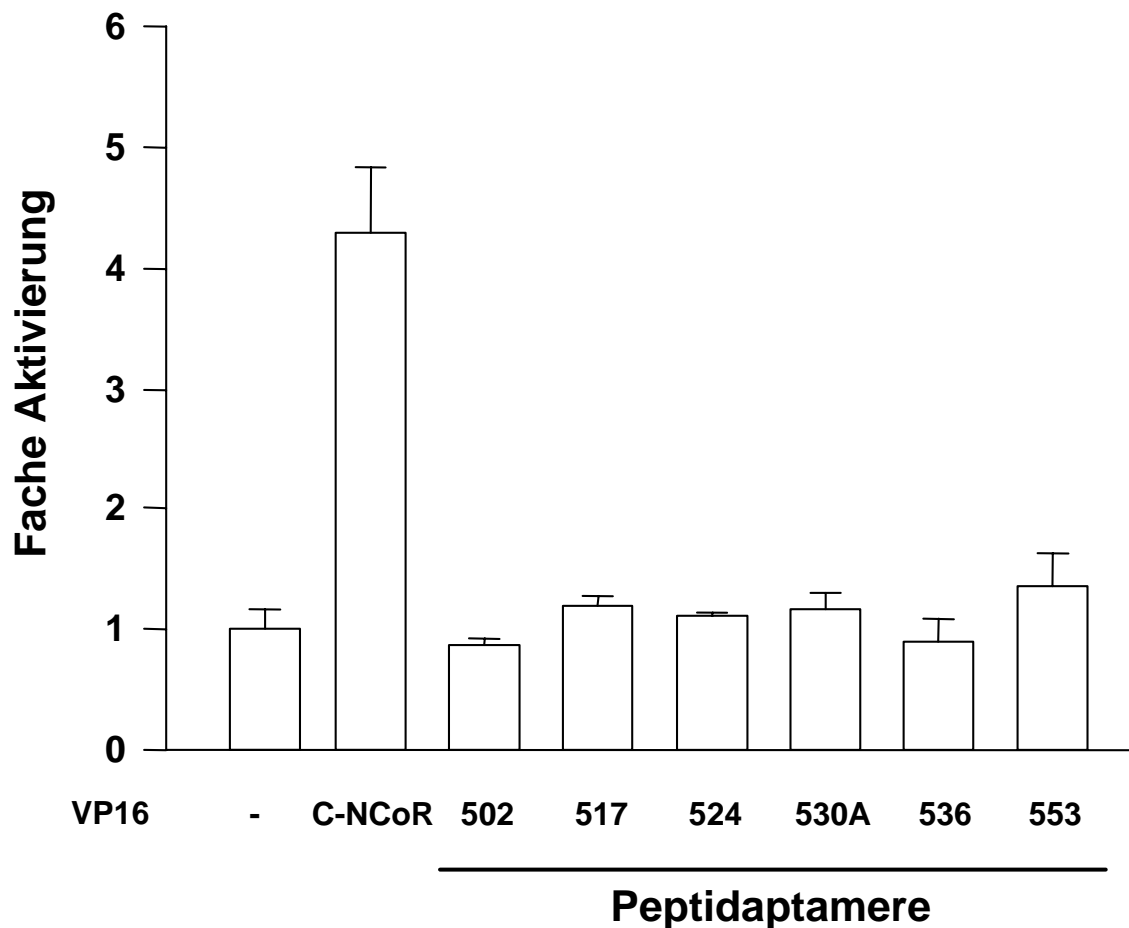


**Abbildung 4-13: Die Peptidaptamere interagieren auch in Gegenwart von CPA und R1881 mit dem AR in Säugerzellen.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5hAR, 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen und frisches Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS sowie die angegebenen Hormone wurde hinzugegeben. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Eine Luziferaseaktivität über 1 wurde hier als „Fache Interaktion“ dargestellt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

Mit dem Ziel, die Interaktionsdomäne der Peptidaptamere im AR genauer zu definieren, wurde das modifizierte Säuger-Zwei-Hybrid-System mit Deletionen des ARs durchgeführt.

Zunächst wurde nach einer Interaktion der Peptidaptamere mit dem N-Terminus des Rezeptors gesucht. Da dieser Teil des ARs die LBD nicht mehr enthält, wurden die mit dem pMMTV-luc Reporter und den entsprechenden Expressionsvektoren transfizierten CV-1-Zellen nicht zusätzlich mit Hormonen behandelt. Die DBD ist in dieser Rezeptor-Deletion noch vorhanden und ermöglicht so die Bindung an den MMTV-Promotor. Weil die hauptsächliche Transaktivierung des Rezeptors durch den N-Terminus vermittelt wird, zeigte sich generell eine deutliche Aktivierung des Reportergens. Im Vergleich zur VP16-Transaktivierungsdomäne alleine, zeigte VP16-C-NCoR eine deutliche vierfache Aktivierung des Reportergens, was die Interaktion des C-Terminus von NCoR mit dem N-Terminus von AR nachweisen

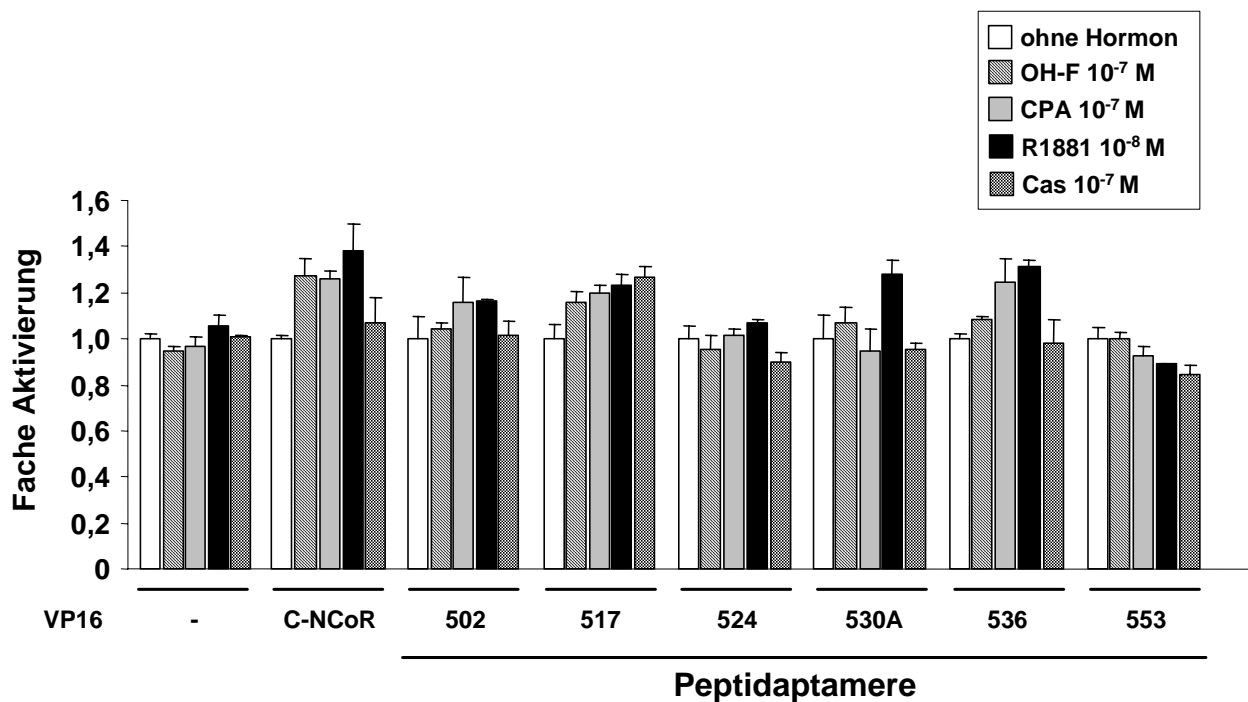
könnte (Abbildung 4-14). Dies ist im Einklang mit der Interaktion des verwandten CoRs SMRT mit dem AR (Dotzlaw et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte bei Kotransfektion der VP16-Peptidaptamere, keine der VP16-Fusionen eine erhöhte Luziferaseaktivität, was darauf hindeutet dass anscheinend keines davon mit dem AR-N-Terminus alleine interagieren kann.



**Abbildung 4-14: Die Peptidaptamere interagieren nicht mit dem N-Terminus des AR alleine.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5-AR-NT (kodiert für den N-Terminus einschließlich der DBD), 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

Anknüpfend an diesen Versuch wurde die potenzielle Interaktion der Peptidaptamere mit dem AR-C-Terminus untersucht (Abbildung 4-15). Auch in dieser Deletion ist die DBD des ARs noch vorhanden und ermöglicht die Bindung an den MMTV-Promotor. Im Gegensatz zur N-terminalen Deletion bewirkt der C-Terminus des Rezeptors nur eine schwache Aktivierung der Luziferaseaktivität. Der C-Terminus des CoRs NCoR

(VP16-C-NCoR) zeigte in diesem Fall keine Interaktion mit der Rezeptordeletion, da dieser mit dem N-Terminus interagiert. Auch führte keine der VP16-fusionierten Peptidaptamersequenzen zu einer Aktivierung des Reportergens und somit konnte keine Interaktion mit dem C-Terminus des AR angezeigt werden. Die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen AR Liganden beeinflusste dieses Resultat nicht signifikant.



**Abbildung 4-15: Die Peptidaptamere interagieren nicht mit dem C-Terminus des AR alleine.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Hormon-abgereichertem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pAB<sub>Δgal</sub>AR<sub>505</sub> (kodiert für den C-Terminus einschließlich der Hinge-Region und der DBD), 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

Grundsätzlich kann zusammengefasst werden, dass die meisten der in Hefen selektierten Peptidaptamere, anscheinend auch in Säugerzellen mit dem AR interagierten. Diese Interaktionen sind Hormon-abhängig, aber scheinbar nicht spezifisch für das im Peptidaptamer-Screen eingesetzte Antihormon OH-F. Für die Interaktion der Peptidaptamere konnte die Interaktionsdomäne im AR nicht genauer definiert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der vollständige Rezeptor für eine im modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System fassbare Interaktion notwendig ist. In einer anderen Arbeitsgruppe identifizierte Peptide, die mit dem AR

interagieren, schienen ebenfalls nur an den kompletten Rezeptor binden zu können (Kazmin et al., 2006).

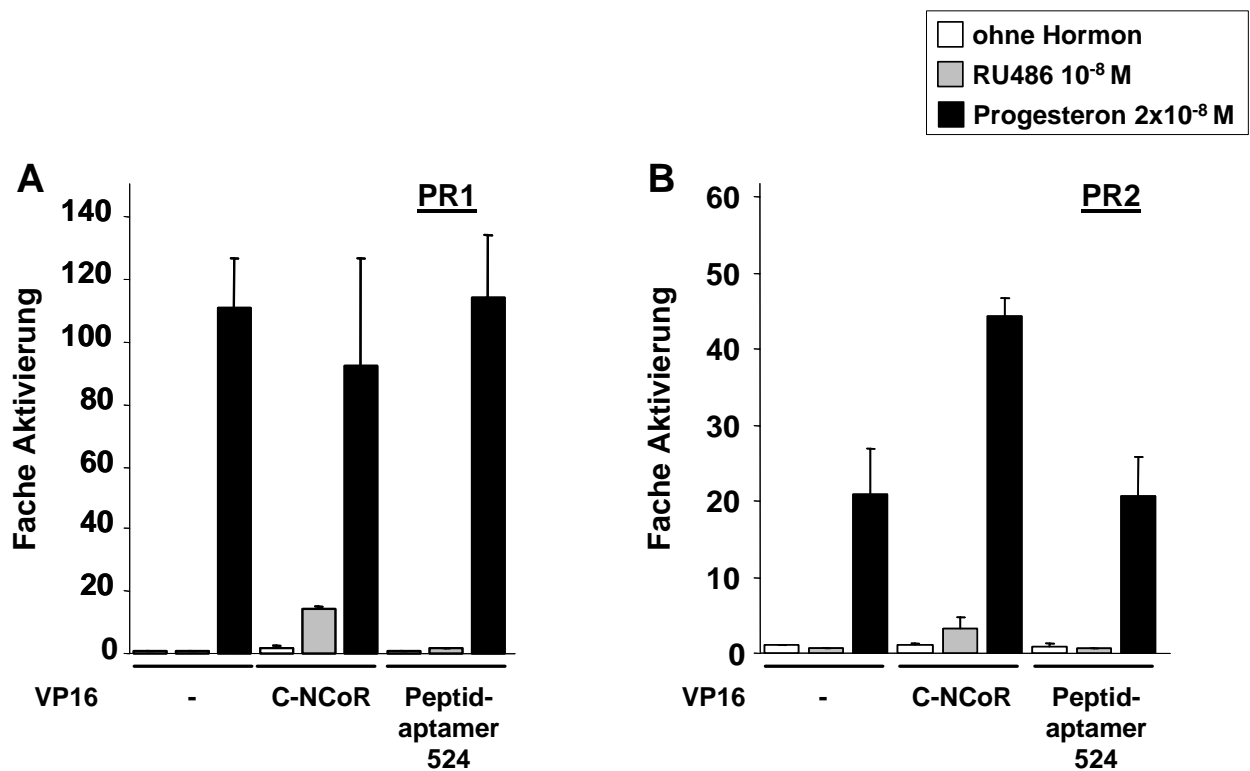
Für die weiterführenden Experimente wurde zunächst das Peptidaptamer 524 ausgewählt, da es anscheinend sowohl an den OH-F- als auch den CPA- oder R1881-gebundenen AR binden kann.

Da die CoRen wie NCoR und SMRT nicht nur mit dem AR, sondern auch mit anderen KHR interagieren, war es von Bedeutung zu analysieren, ob das neu identifizierte Peptidaptamer 524 auch an andere KHRen binden kann. Um in der Prostatakrebstherapie spezifisch die Aktivität des AR zu hemmen, wäre es von großer Wichtigkeit, einen neuen CoR zu entwickeln, der möglichst ausschließlich mit dem AR interagieren kann. Dies würde bei einer potenziellen Therapie die Nebenwirkungen reduzieren.

Mit dem AR sehr nah verwandt sind der Progesteronrezeptor (PR) und der Glucocorticoidrezeptor  $\alpha$  (GR $\alpha$ ). Von großem Vorteil ist hier auch, dass für die Versuche das gleiche Reporterplasmid eingesetzt werden kann, da diese Rezeptoren auch an den MMTV-Promotor binden können.

Es gibt zwei Progesteronrezeptor-Isoformen: PR1 (B-Form) und PR2 (A-Form). Der PR2 ist die kürzere Isoform des Rezeptors, der aufgrund eines internen Translationsstarts eine im N-Terminus verkürzte Variante darstellt. Der kürzere PR2 ist dadurch auch in seiner Transaktivierungsaktivität deutlich schwächer als der PR1. PR1 und PR2 können ebenfalls die Aktivität des MMTV-Promotors regulieren. So wurden im modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System CV-1-Zellen mit dem MMTV-Reporterplasmid transfiziert. Gleichzeitig wurden entweder PR1 oder PR2 zusammen mit der VP16-Transaktivierungsdomäne alleine, VP16-C-NCoR oder VP16-524 kotransfiziert. Das PR-Antihormon RU486, ein partielle Antagonist, führte weder bei PR1 noch bei PR2 zu einer Aktivierung des Reporters zusammen mit dem Kontrollplasmid (Abbildung 4-16 A und B). Progesteron, der natürliche Ligand für den PR, aktivierte den MMTV-Promotor ca. 100-fach durch den PR1 (Abbildung 4-16 A) und ca. 20-fach durch den PR2 (Abbildung 4-16 B). Wurde nun VP16-C-NCoR kotransfiziert, so wurde die Aktivität des Reporters in Gegenwart von RU486 stark aktiviert, sowohl im Fall von PR1 (etwa 17-fach), als auch bei PR2 (etwa vier-fach). In Gegenwart von Progesteron führte VP16-C-NCoR im Fall von PR2 zu einer Verdopplung der Reporteraktivierung (Abbildung 4-16 B). Im Bezug auf PR1 waren

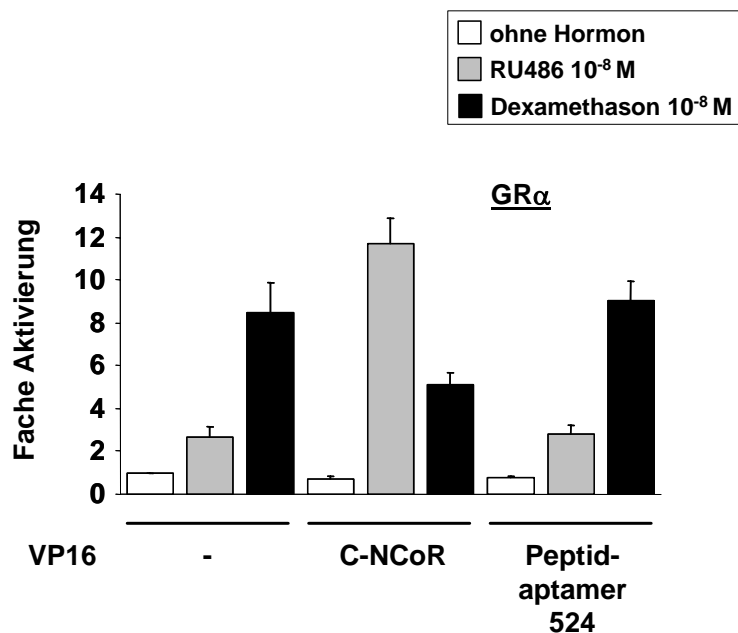
hier keine weitere Induktion und somit scheinbar auch keine Interaktion nachweisbar (Abbildung 4-16 A). Erfasst man im Bezug dazu nun die Ergebnisse mit VP16-524, so führten diese weder in Anwesenheit von Antagonist (RU486) noch von Agonist (Progesteron) mit PR1 oder PR2 zu einer Aktivierung des Reporters, was darauf schließen lässt, dass wahrscheinlich auch keine Interaktion besteht.



**Abbildung 4-16: Das Peptidaptamer 524 interagiert nicht mit den Progesteronrezeptoren 1 und 2.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1  $\mu$ g des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2  $\mu$ g pSG-hPR1 bzw. pSG-hPR2, 2  $\mu$ g der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2  $\mu$ g pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid ohne Hormon wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert. A) Progesteronrezeptor 1. B) Progesteronrezeptor 2.

Im Folgenden wurde das Peptidaptamer 524 auf eine mögliche Interaktion mit dem  $GR\alpha$  hin untersucht. Auch dieser KHR kann an den MMTV-Promotor binden und dessen Aktivität entsprechend regulieren. Die Behandlung der Zellen mit den Liganden RU486 (auch ein  $GR\alpha$ -Antagonist) und Dexamethason ( $GR\alpha$ -Agonist) aktivierten den MMTV-Promotor drei- bzw. achtfach, wenn  $GR\alpha$  und VP16 alleine kotransfiziert wurden (Abbildung 4-17). In Anwesenheit von RU486 aktivierte VP16-C-NCoR die Wirkung des Rezeptors auf den Reporter um weitere vierfach. Der

Dexamethason-gebundene GR $\alpha$  wurde jedoch durch VP16-C-NCoR nicht weiter aktiviert. Tendenziell kam es in dieser Verknüpfung eher zu einer Hemmung der MMTV-Promotor-Aktivität, die sich nicht logisch erklären lässt. Wurde das an VP16-fusionierte Peptidaptamer zusammen mit GR $\alpha$  kotransfiziert, so ergab sich weder ohne Hormon, noch in Verbindung mit RU486 oder Dexamethason eine Steigerung der Reporterogenaktivität. Dies bedeutet, dass anscheinend keine Interaktion zwischen VP16-524 und dem GR $\alpha$  vorliegt.



**Abbildung 4-17: Das Peptidaptamer 524 interagiert nicht mit den Glucocorticoidrezeptor $\alpha$ .** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1  $\mu$ g des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2  $\mu$ g pRSV-hGR $\alpha$ , 2  $\mu$ g der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2  $\mu$ g pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid ohne Hormon wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass das Peptidaptamer 524 scheinbar nicht mit den KHRen PR1, PR2 oder GR $\alpha$  interagieren kann. Die Daten deuten also darauf hin, dass das Peptidaptamer 524 also Rezeptor-spezifisch an den AR bindet.

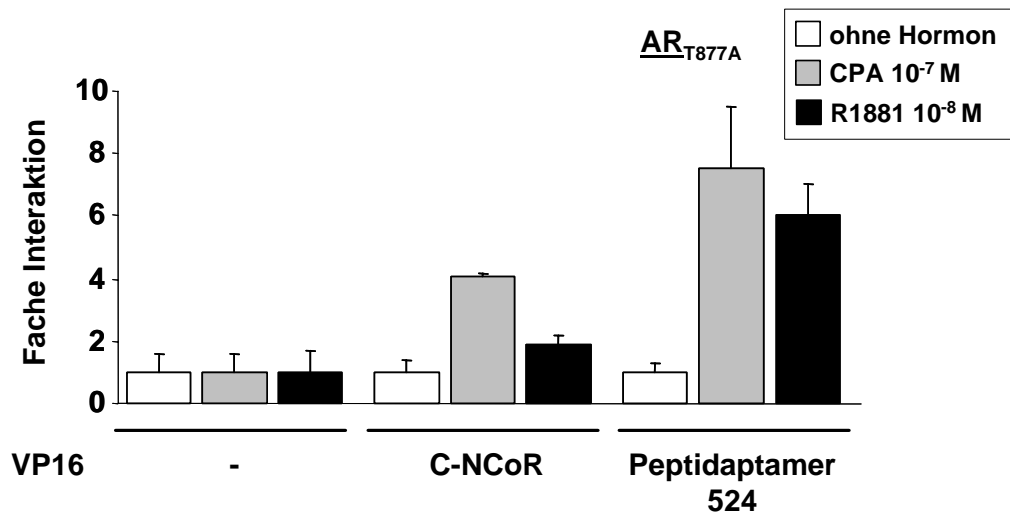
Im Verlauf der Prostatakrebstherapie entstehen unterschiedliche Mutationen im AR, die zu einem neuen, Therapie-unabhängigen Wachstum des Krebses führen können. Eine häufig auftretende Veränderung ist die Mutation T877A (Marcelli et al., 2000). Hier kommt es zu einer Veränderung der AS an Position 877 (in der LBD) von



Threonin zu Alanin. Das Antihormons OH-F wirkt auf diesen mutierten Rezeptor nicht mehr antagonistisch sondern agonistisch. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Generierung eines neuartigen CoRs, der möglicherweise die erfolgreiche Antihormontherapie verlängern könnte. Kommt es nun im Laufe der anfänglichen Behandlung zur Entstehung einer solchen Mutation, so ist es wichtig, dass der neue CoR, auch mit dem veränderten Rezeptor interagieren und diesen somit auch hemmen kann.

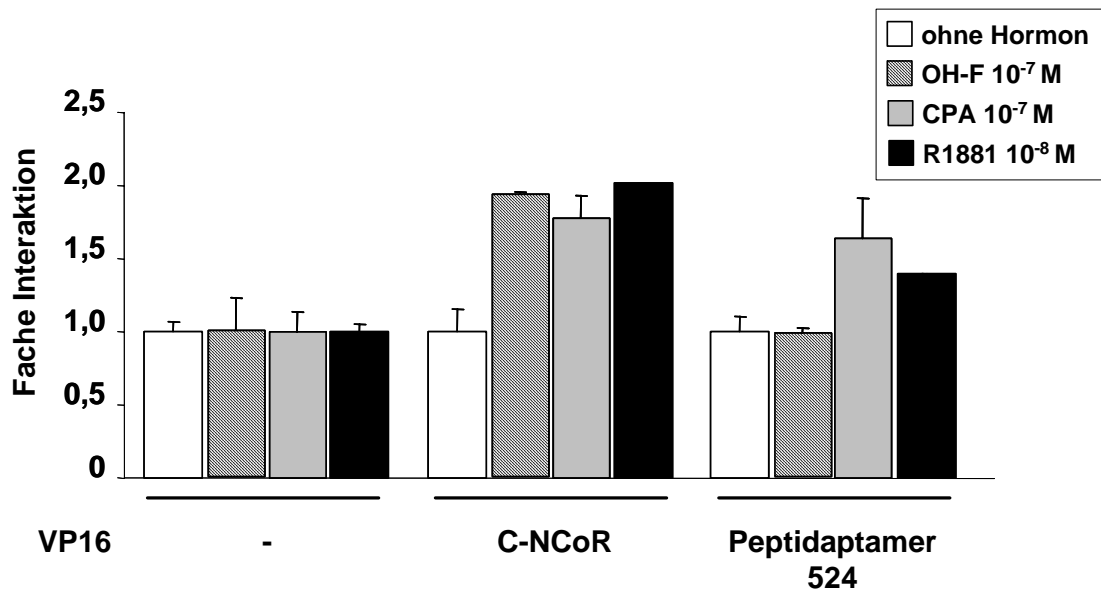
Folglich wurde als nächstes untersucht, ob das Peptidaptamer 524 an den AR<sub>T877A</sub> binden kann. Hierzu wurden im modifizierten Säuger Zwei-Hybrid-System CV-1-Zellen transfiziert. Abbildung 4-18 zeigt als Positivkontrolle die Fache Interaktion zwischen AR<sub>T877A</sub> und VP16-C-NCoR. VP16-C-NCoR führte in Gegenwart von CPA durch die Aktivierung des Reportergens zu einer deutlichen vierfachen Interaktion mit dem Rezeptor. In Gegenwart von R1881 ergibt sich eine leichte Aktivierung der Luziferaseaktivität, was in Abbildung 4-18 als knapp zweifache Interaktion mit dem AR<sub>T877A</sub> dargestellt ist. VP16-524 zeigte in Gegenwart von CPA eine starke fast achtfache Interaktion, die auf Grund der Reportergenaktivierung gegenüber der Kontrolle ohne Hormon ermittelt wurde. Auch in Anwesenheit von R1881 scheint eine sechsfache Interaktion vorzuliegen. Die Aktivierung des Reporters sind hier wahrscheinlich auf Grund einer scheinbar leichteren Aktivierbarkeit von AR<sub>T877A</sub> höher als mit dem Wildtyp-AR.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Peptidaptamer 524 scheinbar sowohl mit dem Wildtyp-AR, als auch mit der AR-Mutante T877A interagieren kann.



**Abbildung 4-18: Das Peptidaptamer 524 interagiert mit dem AR<sub>T877A</sub>.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5hAR<sub>T877A</sub>, 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

AR<sub>T877A</sub> ist die Variante des endogenen AR in der Prostatakrebszelllinie LNCaP. Da in dieser Zelllinie ein potenziell Wachstums-hemmender Effekt des neuen CoR untersucht werden soll, wurde als nächstes eine modifiziertes Säuger-Zwei-Hybrid-Analyse in LNCaP-Zellen mit dem endogen exprimierten AR<sub>T877A</sub> durchgeführt. Des Weiteren wurde hier statt dem Reporterplasmid pMMTV-luc ein PSA-reguliertes Reporterplasmid (pPSA-luc) eingesetzt. Es war hier interessant zu untersuchen, ob auch auf diesem Promotor eines humanen AR-regulierten Zielgens eine Interaktion mit dem Peptidaptamer 524 vorliegt. Für diesen Versuch wurden LNCaP-Zellen mit dem PSA-regulierten Reporterplasmid und VP16-Leervektor, VP16-C-NCoR oder VP16-524 kotransfiziert. Die Zellen wurden entweder ohne Hormon oder in Gegenwart von OH-F, CPA oder R1881 gehalten. Im Vergleich zum VP16-Leervektor zeigte VP16-C-NCoR in Anwesenheit aller drei Liganden durch die Aktivierung der Reportergergenaktivität eine etwa zweifache Interaktion mit dem endogenen AR<sub>T877A</sub> (Abbildung 4-19). Auch für VP16-524 war in Gegenwart von CPA und R1881 eine ca. anderthalbfache Interaktion durch die Aktivierung des Reportergens mit dem AR<sub>T877A</sub> detektierbar. In Gegenwart von OH-F schien in diesem Experiment keine Bindung mit AR<sub>T877A</sub> vorzuliegen.



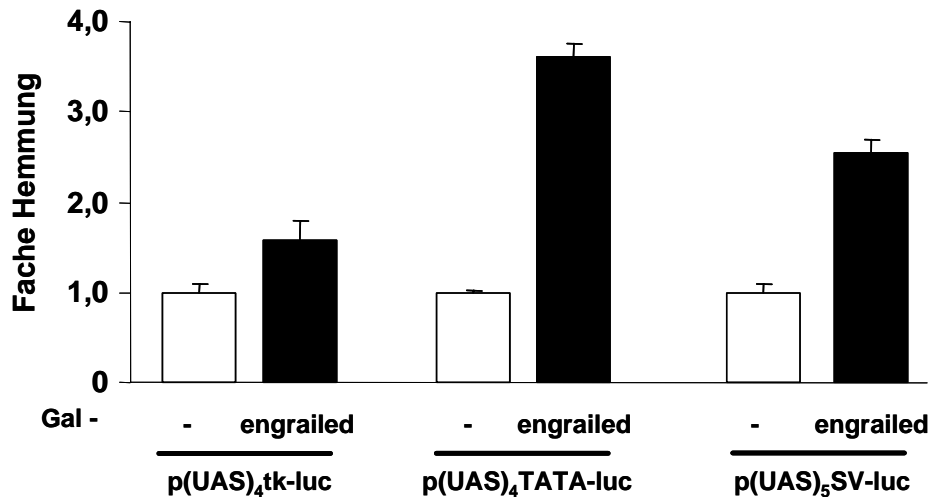
**Abbildung 4-19: Das Peptidaptamer 524 interagiert mit dem endogenen AR<sub>T877A</sub> auf dem PSA-Promotor in LNCaP-Zellen.** LNCaP-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pPSA-luc, 2 µg der VP16-Fusionskonstrukte und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. 6 h später wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Peptidaptamer auch in der Prostatakrebszelllinie LNCaP mit dem AR<sub>T877A</sub> interagiert. Diese Interaktion scheint spezifisch für die Liganden CPA und R1881, da in Gegenwart von OH-F keine Aktivierung des PSA-Reporters und somit wohl auch keine Interaktion detektierbar ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das im Hefe-Screen identifizierte Peptidaptamer 524 auch in Säugerzellen als Bindemotiv für den AR hinreichend einsatzfähig ist. Dieses Bindemotiv interagiert Hormon-abhängig (in Gegenwart OH-F, CPA oder R1881) mit dem Wildtyp-AR und AR<sub>T877A</sub> auf dem MMTV-Promotor in CV-1-Zellen als auch mit der endogen in LNCaP-Zellen exprimierten Mutante AR<sub>T877A</sub> auf dem PSA-Promotor (in Gegenwart von CPA und R1881). Des Weiteren scheint die Bindung AR-spezifisch zu sein. Das Peptidaptamer 524 stellt also eine geeignete Interaktionsdomäne für einen neuen CoR dar.

### 4.3.2 Die Identifizierung einer potenten Repressionsdomäne für den neuen Corepressor

Um aus dem Hormon-abhängig mit dem AR interagierenden Peptidaptamer 524 einen funktionellen CoR herzustellen, muss diese Bindedomäne an eine potente und möglichst kleine Repressionsdomäne fusioniert werden. Engrailed wurde bereits als ein Protein beschrieben, welches eine starke, gut charakterisierte und eingegrenzte Repressionsdomäne besitzt (Jaynes and O'Farrell, 1991). In transienten Transfektionen wurde das Repressionspotenzial, der an eine Gal4-DBD-fusionierten Engrailed-Repressionsdomäne (Gal-en<sub>sil</sub>) analysiert. Die Gal4-DBD dient zur Rekrutierung an die UAS der eingesetzten Reporterplasmide. CV-1-Zellen wurden mit je einem der Reporterkonstrukte p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc, p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc oder p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc transfiziert, die im Promotor vier bzw. fünf Bindestellen (UAS) für die Gal4-DBD enthalten. Es wurden verschiedene Reporterplasmide verwendet, um auszuschließen, dass eine detektierte Repression nur mit einem bestimmten Promotor funktioniert. Es wurde die Gal4-DBD alleine oder Gal-en<sub>sil</sub> kotransfiziert. Im Vergleich zur Aktivität der Gal4-DBD zeigt Gal-en<sub>sil</sub> auf p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc eine anderthalbfache Hemmung (Abbildung 4-20). Auf dem Reporter p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc konnte Gal-en<sub>sil</sub> eine dreieinhalbfache Hemmung bewirken. Und auf p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc zeigte Gal-en<sub>sil</sub> eine zweieinhalbfache Hemmung der Reporterogenaktivität. Dieses Repressionspotenzial erscheint etwas zu schwach, um für die Generierung eines neuen CoRs zu funktionieren.

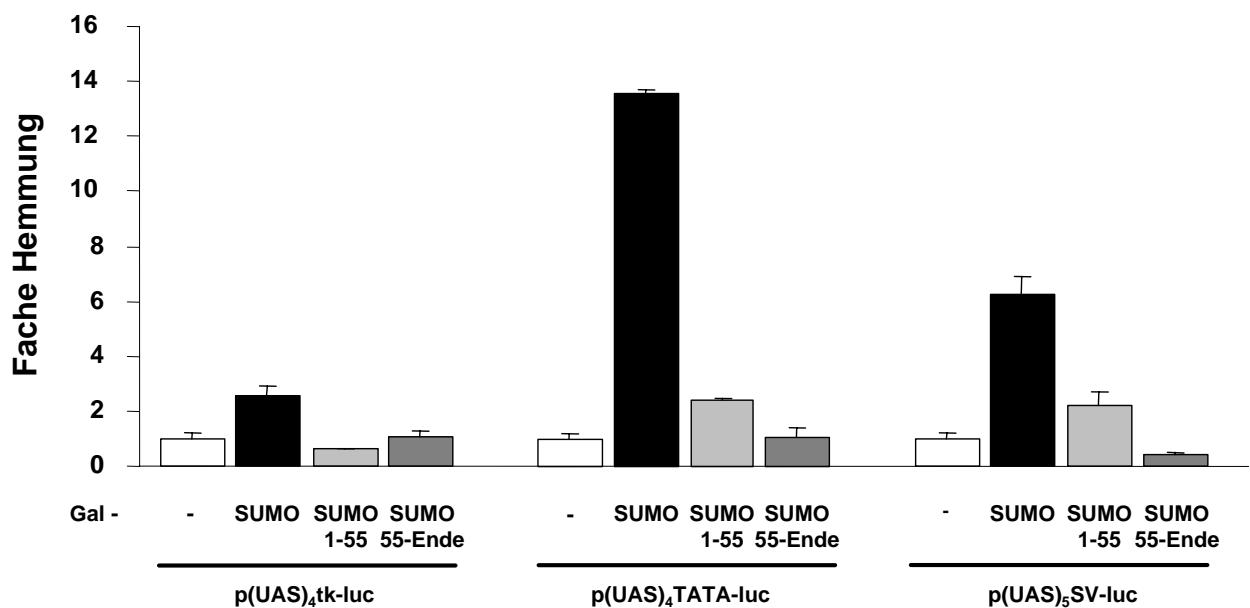


**Abbildung 4-20: Engrailed besitzt eine schwache Repressionsaktivität.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit unbehandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des jeweiligen Reporterplasmids (p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc, p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc oder p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc), 1 µg des Gal-Engrailed-Fusionsplasmids pAB-Gal<sub>94</sub>-en<sub>sil</sub> und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem leeren Gal-Expressionsvektor wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind mit Hilfe der β-Galactosidaseaktivitätsbestimmung normalisiert.

#### 4.3.2.1 SUMO besitzt eine starkes Repressionspotenzial

Ein weiterer Faktor mit dem Potenzial, die Transkriptionsaktivität zu hemmen, ist SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Yang et al., 2003). SUMO wird üblicherweise an Lysine in Proteinen mit entsprechender Erkennungssequenz kovalent gebunden. Diese sog. SUMOylierung führt zu verschiedenen Effekten im Bezug auf das modifizierte Protein. Zu diesen Effekten zählen z. B.: Proteindestabilisierung, Proteindegradierung und Protein-Lokalisierungen (Hay, 2005). Für diese Arbeit ist von Interesse, dass die Rekrutierung von SUMO selbst an Promotorbereiche von Genen zu einer Hemmung der Transkription führt. Diese Repression ist unabhängig vom eigentlichen SUMOylierungsvorgang. Da SUMO sich als relativ kleines Protein (101 AS) ebenfalls als Repressionsdomäne für den neuen CoR eignen würde, wurde als nächstes die Hemmungskapazität von SUMO getestet. Hierfür wurde SUMO als Gal-Fusion zusammen mit den Reporterplasmiden p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc, p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc oder p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc in CV-1-Zellen kotransfiziert. Als Kontrolle diente die Gal4-DBD alleine, im Vergleich zu welcher Gal-SUMO auf p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc zu einer dreifachen Hemmung der Reporteraktivität führte (Abbildung 4-21). Auf p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc konnte Gal-SUMO die Transkription knapp 14-fach reprimieren. Zusammen mit p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc entstand eine sechsfache Herunterregulierung der

Reportergenaktivität. Mit dem Ziel die Repressionsdomäne von SUMO weiter einzuschränken, um noch eine kleinere Domäne zu erhalten, wurden im selben Versuch entweder nur der N- oder der C-Terminus von SUMO betrachtet. Allerdings zeigten diese Deletionen auf keinem der eingesetzten Reporterplasmide eine starke reprimierende Wirkung. Folglich wären diese kürzeren Fragmente von SUMO zu klein, um einen potenten CoR zu etablieren.

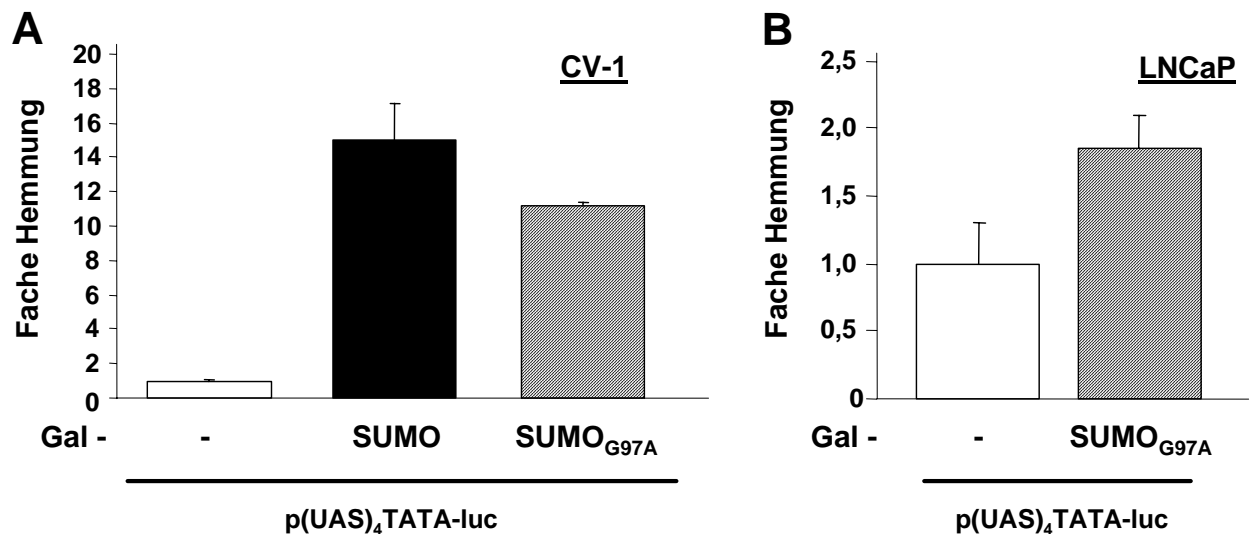


**Abbildung 4-21: SUMO besitzt eine starke Repressionsdomäne.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit normalem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des jeweiligen Reporterplasmids (p(UAS)<sub>4</sub>-tk-luc, p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc oder p(UAS)<sub>5</sub>-SV-luc), 1 µg des jeweiligen GAL-SUMO-Fusionsplasmids (pABGal<sub>94</sub>-SUMO, pABGal<sub>94</sub>-SUMO1-55 oder pABGal<sub>94</sub>-SUMO55-Ende) und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind normalisiert.

Für den neuen CoR ist die SUMOylierung von Proteinen nicht erwünscht ist, da dies zu unspezifischen Wirkungen des CoRs führen könnte. Daher wurde eine mutierte Version von SUMO, SUMO<sub>G97A</sub>, auf ihre Hemmungseigenschaften hin untersucht. Die Mutation in SUMO<sub>G97A</sub> verhindert die kovalente Verknüpfung von SUMO an Lysine (Kamitani et al., 1997).

In CV-1-Zellen (Abbildung 4-22 A) zeigt SUMO<sub>G97A</sub> gegenüber der Wildtyp-Variante eine vergleichbar starke Repressionsaktivität (12- bzw. 15-fach) auf dem Reporterkonstrukt p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc. SUMO<sub>G97A</sub> kann die Aktivität des Reportergens auch in der Prostatakrebszelllinie LNCaP hemmen (Abbildung 4-22 B). Diese Hemmung ist schwächer als in CV-1-Zellen. Möglicherweise liegt dies an einer

deutlich schwächeren Transfizierbarkeit der LNCaP-Zellen. Denkbar wäre auch, dass die Repression in LNCaP-Zellen tatsächlich nicht mit der Stärke der Hemmung in CV-1-Zellen vergleichbar ist. Die hier gezeigte Hemmung durch SUMO<sub>G97A</sub> in LNCaP-Zellen ist wichtig damit in diesen Zellen SUMO<sub>G97A</sub> zusammen mit dem Bindemotiv (Peptidaptamer 524) als neuer CoR die Aktivität des ARs hemmen konnte.



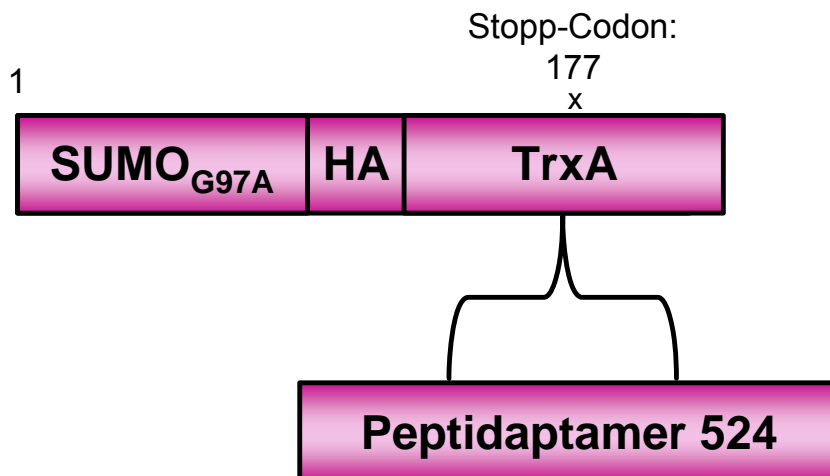
**Abbildung 4-22: Die Repression von SUMO ist unabhängig vom SUMOylierungsvorgang.** CV-1-Zellen (A) oder LNCaP-Zellen (B) wurden in Medium mit unbehandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg Reporterplasmids p(UAS)<sub>4</sub>-TATA-luc, 1 µg des jeweiligen Gal-SUMO-Fusionsplasmids (pABGal<sub>94</sub>-SUMO, pABGal<sub>94</sub>-SUMO<sub>G97A</sub>) und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind normalisiert.

Gegenüber der Repressionsdomäne von Engrailed ( $en_{sil}$ ) war die Hemmwirkung von SUMO<sub>G97A</sub> in CV-1-Zellen wesentlich stärker. Für die Konstruktion des neuen CoR wurde daher SUMO<sub>G97A</sub> als Repressionsdomäne ausgewählt.

Zusammen mit der Hormon-abhängig mit dem AR interagierenden Bindedomäne (Peptidaptamer 524) kann nun das Peptid konstruiert werden, welches an den AR binden und dessen Transaktivierung hemmen soll. Im Folgenden wird dieser neuartige CoR auch als T-Pep 524 (therapeutisches Peptid 524) bezeichnet werden.

### 4.3.3 Der neue Corepressor (T-Pep 524) hemmt das Wachstum von Prostatakrebszellen

Zur Generierung von T-Pep 524 wurden beide Domänen zu einem Peptid fusioniert, was N-terminal die Repressionsdomäne (SUMO<sub>G97A</sub>) und C-terminal die Interaktionsdomäne (Peptidaptamer 524) enthält (Abbildung 4-23).



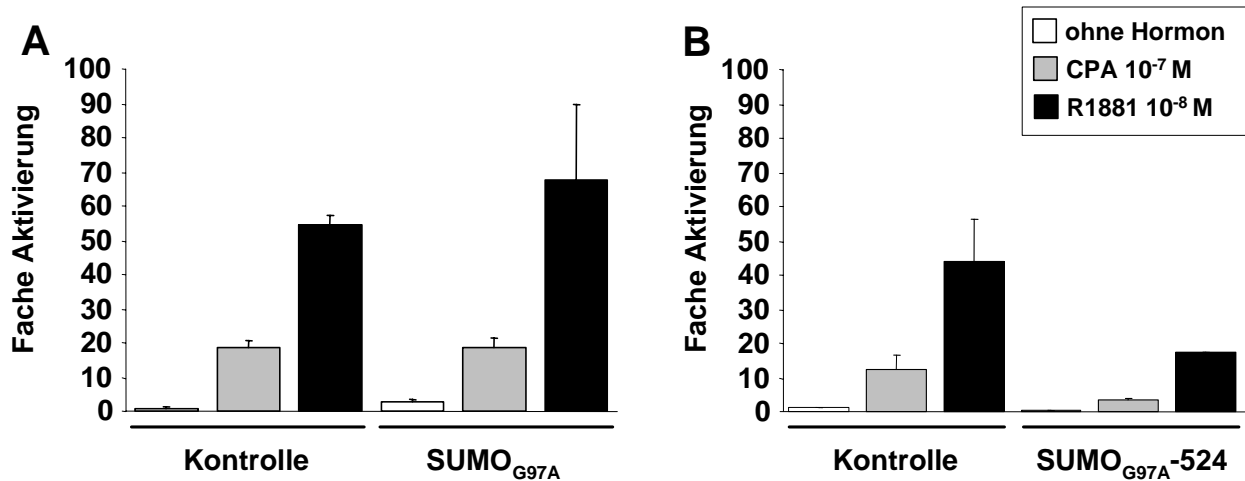
**Abbildung 4-23: Schematische Darstellung des neuen CoRs T-Pep 524.** Für die Generierung des neuen CoRs (T-Pep 524) wurde das Peptidaptamer 524 (inklusive HA-Epitop) an SUMO<sub>G97A</sub> fusioniert. Die Zahlen geben die AS-Position an. Hinter der AS-Position 177 befindet sich das Stopp-Codon, wodurch der C-terminale Teil von TrxA nicht mehr exprimiert wird.

#### 4.3.3.1 T-Pep 524 hemmt die Transaktivierung des Androgenrezeptors

Zunächst musste nun geprüft werden, ob der neue CoR (T-Pep 524), durch die Bindung an den AR, auch dessen Transaktivierung hemmen kann. Dazu wurden CV-1-Zellen mit dem Androgen-sensitiven pMMTV-luc-Reporterplasmid transfiziert. Gleichzeitig wurden die Expressionsplasmide für den AR und SUMO<sub>G97A</sub> oder die Fusion SUMO<sub>G97A</sub>-524 kotransfiziert. Als Kontrolle diente der entsprechende Leervektor. Die Ergebnisse zeigen, dass SUMO<sub>G97A</sub> alleine zu keiner signifikanten Hemmung der AR-Transaktivierung führte (Abbildung 4-24 A), weder ohne Hormon noch in Anwesenheit von CPA oder R1881. Die Fusion von SUMO<sub>G97A</sub> an das Peptidaptamer 524 ergab im Vergleich zur Kontrolle eine dreifache Hemmung der CPA-induzierten AR-Aktivität. In Gegenwart von R1881 resultierte T-Pep 524 in einer zweieinhalbfachen Hemmung der Reporter-genaktivierung (Abbildung 4-24 B).



Zusammenfassend kann man sagen, dass der neue CoR, T-Pep 524, in Gegenwart der Liganden CPA und R1881 die Transaktivierung des ARs in CV-1-Zellen auf dem MMTV-Promotor hemmt.

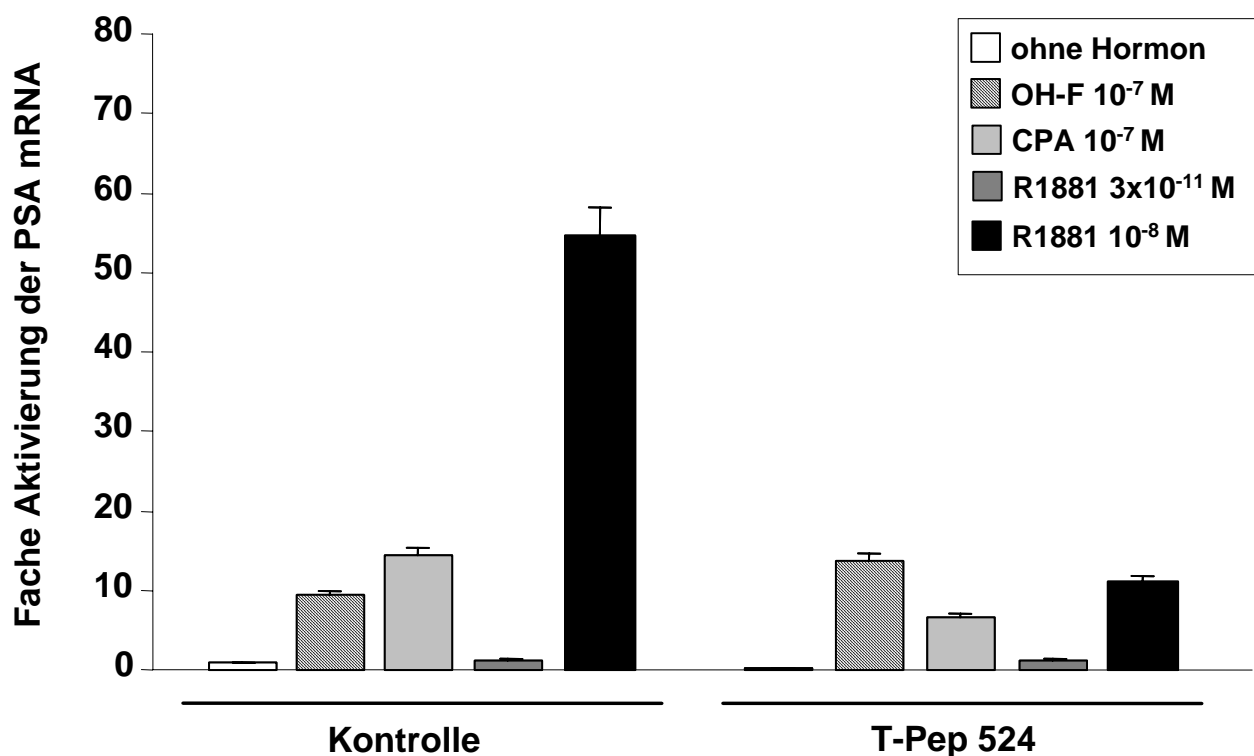


**Abbildung 4-24: Das T-Pep 524 hemmt die Transaktivierung des AR.** CV-1-Zellen wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS in 6-well Schalen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 1 µg des Reporterplasmids pMMTV-luc, 0,2 µg pSG5hAR, 2 µg des SUMO<sub>G97A</sub>-Fusionskonstruktes (pCDNA3-ATG-SUMO<sub>G97A</sub>-524) oder SUMO<sub>G97A</sub> alleine (pCDNA3-ATG-SUMO<sub>G97A</sub>) und 0,2 µg pCMV-lacZ transfiziert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionsmix mit PBS von den Zellen gewaschen. Das frische Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS enthielt die angegebenen Hormone. Nach weiteren 72 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung an. Die Luziferaseaktivität mit dem Kontrollplasmid ohne Hormon wurde jeweils 1 gesetzt.

#### 4.3.3.2 T-Pep 524 hemmt die Expression eines Androgenrezeptor-Zielgens

Von besonderem Interesse war nun, ob der neue CoR, T-Pep 524, die Expression eines endogenen AR-Zielgens hemmen kann. Das PSA-Gen ist ein Androgen-abhängig exprimiertes Gen und ein Standardmarker Marker für die Diagnose des Prostatakarzinoms. Für diesen Versuch wurden RNA-Extrakte von stabil mit T-Pep 524 transfizierten LNCaP-Zellen präpariert und in einer quantitativen *Real-Time*-PCR eingesetzt (Abbildung 4-25). In den Kontrollzellen steigt die Expression der PSA-mRNA in OH-F behandelten Zellen im Vergleich zu ohne Hormon (Abbildung 4-25) da dieser Antagonist in LNCaP-Zellen als Agonist wirkt. Auch der partielle Agonist CPA aktiviert die mRNA Expression gegenüber der Kontrolle ohne Hormon. Der agonistische Ligand R1881 aktiviert die PSA mRNA-Menge in einer geringen Konzentration ( $3 \times 10^{-11}$  M) nur sehr wenig. In einer höheren Konzentration ( $10^{-8}$  M) aktiviert R1881 die Expression von PSA dagegen erwartungsgemäß sehr stark (Abbildung 4-25). Im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen, ist die PSA

mRNA-Menge in den stabil mit T-Pep 524 transfizierten Zellen bereits in der Abwesenheit von Hormon leicht reduziert. Wurden die stabil transfizierten Zellen mit OH-F behandelt, so ergab sich keine Hemmung der PSA-Expression (Abbildung 4-25). In Gegenwart von CPA kommt es in den T-Pep 524 exprimierenden Zellen zu einer zweieinhalb-fachen Reduktion der PSA-mRNA. Wurden diese Zellen mit der geringen R1881-Konzentration ( $3 \times 10^{-11}$  M) behandelt, kam es im Vergleich zu den Kontrollzellen zu keinem Effekt. Die starke Erhöhung der PSA-mRNA in den Kontrollzellen in Gegenwart von  $10^{-8}$  M R1881 wurde durch T-Pep 524 in den stabil transfizierten Zellen fñnfach reprimiert.



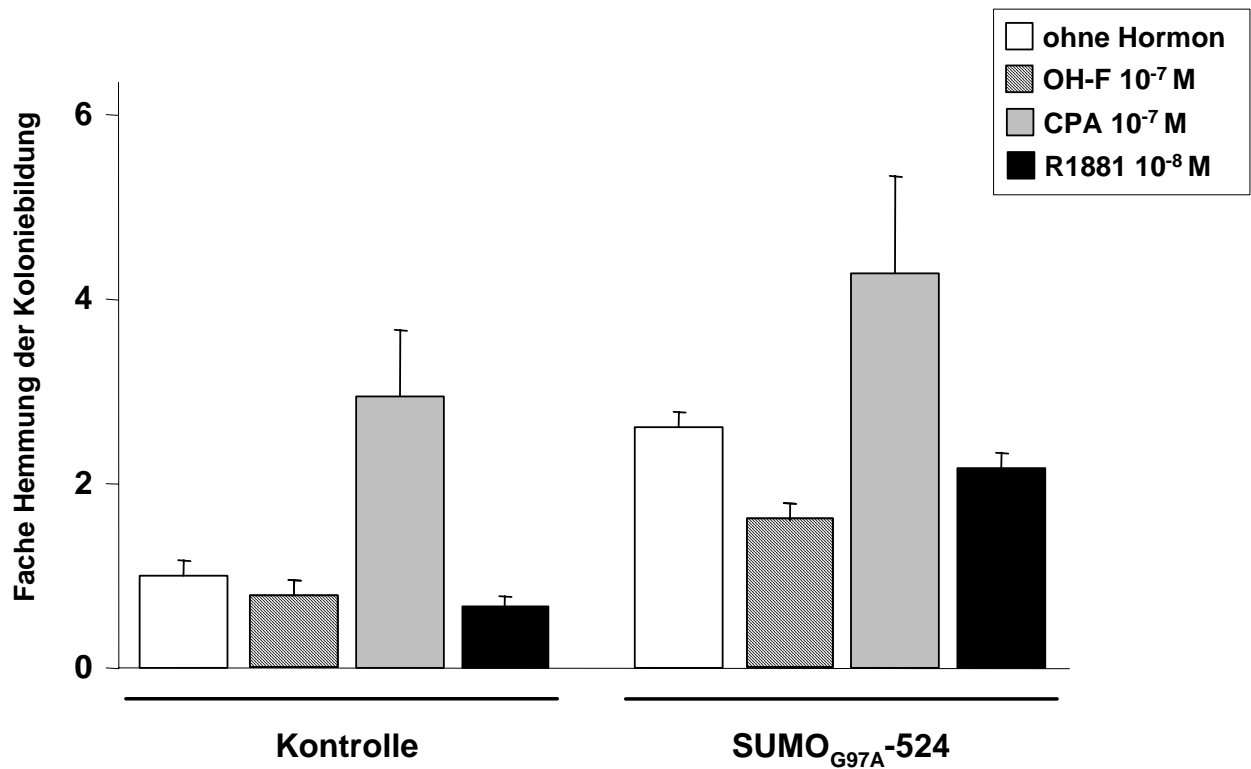
**Abbildung 4-25: T-Pep 524 hemmt die Expression des AR-Zielgens PSA.** LNCaP-Zellen bzw. ein stabil mit T-Pep 524 transfizierter LNCaP-Zellpool wurden in Medium mit Aktivkohle-behandeltem FCS ausgesät. 48 h später wurde das Medium durch frisches Medium ohne Hormon, mit  $10^{-7}$  M OH-F,  $10^{-7}$  M CPA,  $3 \times 10^{-11}$  M R1881 oder  $10^{-8}$  M R1881 ersetzt. Die PSA RNA-Menge wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die RNA-Menge in Kontrollzellen in der Abwesenheit von Hormon wurde gleich 1 gesetzt. Das Ergebnis wurde durch die Verrechnung mit der  $\beta$ -Actin RNA-Menge normalisiert. Der Fehler zeigt die Abweichung einer Doppelbestimmung.

Man kann also zusammenfassen, dass T-Pep 524 die Expression der PSA-mRNA in Gegenwart von OH-F nicht hemmt. Dies passt zu der Vermutung, dass das Peptidapamer in OH-F behandelten LNCaP-Zellen auch nicht mit AR<sub>T877A</sub> auf dem PSA-Promotor interagiert (Abbildung 4-19). Die durch CPA und R1881 erhöhte

Expression des endogenen PSA-Gens in den Kontrollzellen wird anscheinend durch den neuen CoR T-Pep 524 gehemmt.

#### 4.3.3.3 T-Pep 524 hemmt die Proliferation von LNCaP-Zellen

Wie zuvor gezeigt, hemmt T-Pep 524 (SUMO<sub>G97A</sub>-524) die Transaktivierungsaktivität des ARs als auch die Expression des endogenen AR-regulierten PSA-Gens. Um jetzt zu untersuchen, ob diese Hemmung auch zu einer verminderten Proliferation der Prostatakrebszelllinie LNCaP führt, wurde ein *Colony Formation Assay* (Kapitel 3.10.8) durchgeführt. Hierfür wurden LNCaP-Zellen entweder mit einem Kontrollvektor (pETE-Hyg) oder dem Expressionsvektor für das an SUMO<sub>G97A</sub>-fusionierte Peptidaptamer 524 (pETE-Hyg-SUMO<sub>G97A</sub>-524, T-Pep 524) stabil transfiziert. Bei der stabilen Transfektion werden die LNCaP-Zellen nach der Transfektion unter Antibiotikaselektion gehalten, so dass nur diese Zellen überleben, die das Plasmid (mit dem Antibiotikaresistenzgen) aufgenommen haben. Die Zellen wurden entweder ohne oder mit OH-F, CPA oder R1881 kultiviert. Entsprechend ergab sich für die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen eine leichte Erhöhung der Koloniezahl in Gegenwart der auf den endogenen AR<sub>T877A</sub> agonistisch wirkenden Liganden OH-F und R1881 (Abbildung 4-26). Das Antihormon CPA führte zu einer dreifachen Hemmung der Koloniebildung (Abbildung 4-26). In den stabil mit T-Pep 524 transfizierten LNCaP-Zellen kam es ohne Hormon zu einer knapp dreifachen Hemmung der Koloniezahl. Es ist hier zu beachten, dass mit dem unbehandeltem FCS wahrscheinlich schon eine Interaktion zwischen T-Pep 524 und dem AR<sub>T877A</sub> bestehen und es dadurch bereits zu einer Hemmung kommen könnte, da in unbehandeltem FCS auch Hormone vorhanden sind. In Gegenwart von OH-F oder R1881 kam es zusammen mit T-Pep 524 zu einer Aufhebung der Proliferationsfördernden Wirkung dieser beiden Liganden. In Gegenwart von CPA entstanden noch weniger Kolonien. Hier kam es also durch T-Pep 524 anscheinend zu einer verstärkten Wachstumshemmung in Anwesenheit des Antihormons. T-Pep 524 kann also die Antihormon-induzierte Wachstumshemmung weiter verstärken.



**Abbildung 4-26: Das T-Pep 524 verstärkt die Hemmung der Proliferation von LNCaP-Zellen in Gegenwart des Antihormons CPA und hebt die Wachstums-fördernden Wirkungen von OH-F und R1881 auf.** LNCaP-Zellen wurden in Medium mit 5 % unbehandeltem FCS in 10 cm Schalen ausgesät und stabil mit je 7,5  $\mu\text{g}$  der Vektoren pETE-Hyg (Kontrolle) oder pETE-Hyg-SUMO<sub>G97A</sub>-524 (T-Pep 524) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 200  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin selektiert und entweder ohne Hormon oder in Gegenwart von  $10^{-7}$  M OH-F,  $10^{-7}$  M CPA oder  $10^{-12}$  M R1881 kultiviert. Die Hemmung der Koloniebildung ist gezeigt. Die Koloniezahl der Kontrolle ohne Hormon wurde gleich 1 gesetzt. Der Fehler zeigt die Abweichung von Dreifachbestimmungen.

## 5 Diskussion

### ***5.1 Corepressoren sind an der Hemmung des Wachstums von Prostatakrebszellen in der Antihormontherapie beteiligt***

In der Antihormontherapie werden Antihormone (Androgen-Antagonisten) eingesetzt, die die Proliferation der Prostatakrebszellen hemmen (Berrevoets et al., 2002; Fuhrmann et al., 1998). Solche Antihormone sind u. a. CPA, OH-F und Casodex. Es ist bekannt, dass diese Antihormone die Interaktion von CoR mit dem AR fördern und dadurch die Expression von AR-Zielgenen schwächen (Dotzlaw et al., 2002; Shang et al., 2002). Ob die Interaktion mit und die Hemmung des AR durch die CoRen für die Proliferationshemmung eine Rolle spielen, war aber bisher noch nicht klar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der CoRen  $\text{Alien}\alpha$  und SMRT das Wachstum der Prostatakrebszelllinie LNCaP hemmt. LNCaP-Zellen sind Prostatakrebszellen, die als Modellsystem für Hormon-abhängigen Prostatakrebs dienen. Die Hemmung durch die beiden CoRen konnte bereits ohne zusätzliche Hormone (Agonisten oder Antagonisten), aber in Gegenwart von 5 % unbehandeltem FCS beobachtet werden. Unbehandeltes FCS enthält auch Androgene, welche die Interaktion zwischen dem AR und den CoRen ermöglichen. Wurde speziell das Antihormon CPA bei der Kultivierung der Zellen eingesetzt, so führte das in Kontrollzellen bereits zu einer moderaten Hemmung des Zellwachstums. Darüber hinaus konnte die Proliferation zusammen mit der Überexpression von  $\text{Alien}\alpha$  jedoch deutlich reduziert werden. Dieser additive Effekt könnte durch die von CPA geförderte Interaktion zwischen AR und  $\text{Alien}\alpha$  erklärt werden. Ebenso ist es möglich, dass durch die Verschiebung des Gleichgewichts, hin zu einer Überrepräsentierung des CoR, eine deutliche Hemmung des Wachstums erreicht werden konnte. Wurde SMRT überexprimiert wurde das Wachstum der LNCaP-Zellen bereits ohne Hormon sehr potent vermindert. In Gegenwart von CPA konnte hier kaum eine weitere Reduzierung der Kolonienanzahl entstehen. Zwei Aspekte könnten hier eine wichtige Rolle spielen. Zum einen sind im unbehandeltem Serum Hormone vorhanden, die bereits die Interaktion zwischen SMRT und AR ermöglichen. Zum anderen ist SMRT nicht nur ein CoR für den AR, sondern auch an der Repression anderer Transkriptionsfaktoren beteiligt (Chen and Evans, 1995;

Chen and Li, 1998; Jayne et al., 2006; Polo et al., 2004; Yan et al., 2004), die unabhängig vom AR zur Hemmung der Zellproliferation führen könnten.

Dennoch lässt sich sagen, dass CoRen an der Wachstums-hemmenden Wirkung der AR-Antagonisten beteiligt sind und daher für den positiven Verlauf der Antihormontherapie eine wichtige Rolle spielen könnten.

Weitere Hinweise auf diese wichtige Funktion der CoR sind, dass sich im Weiteren, Androgen-unabhängigen Verlauf der Erkrankung, die Expression der Cofaktoren, CoAen und CoRen, verändern (Gregory et al., 2001; Liu et al., 2002). Das heisst, dass CoAen überexprimiert und die Expression der CoRen herunterreguliert werden können. Dadurch sind verhältnismäßig gesehen zu viele CoAen vorhanden, die den AR aktivieren können. Da die Interaktion zwischen dem Rezeptor und CoA bzw. CoR nicht strikt nur durch die Art des Liganden (Agonist oder Antagonist) bestimmt wird, so führt ein Überangebot an CoA zu einer erhöhten Bindung der AR-aktivierenden Cofaktoren und zur verstärkten Genaktivierung. Desgleichen wurde bereits beschrieben, dass Veränderungen in der Regulierung von Signaltransduktionswegen, die Interaktion zwischen dem CoR SMRT und dem AR negativ beeinflussen (Dotzlaw et al., 2002). Auch dies kann dann wiederum zu einem Wachstums-fördernden Effekt führen. Das bedeutet, dass die Verfügbarkeit von funktionellen CoRen, essentiell für eine erfolgreiche Antihormontherapie zu sein scheint.

## **5.2 Minimale Bindemotive**

Um für einen Transkriptionsfaktor wie den AR als CoR zu fungieren, müssen beide Proteine miteinander interagieren. Es ist bekannt, dass die CoRen NCoR und SMRT über sog. CoRNR-Boxen in den C-Termini mit den KHRen TR, RAR und RXR interagieren (Cohen et al., 2001; Hu et al., 2001). Die minimalen Interaktionsdomänen umfassen jeweils ca. 20 bis 30 AS (Hu et al., 2001) rund um die Konsensussequenz LXXXIXXXI/L. Die flankierenden Bereiche bestimmen die spezifische Interaktion mit den verschiedenen KHR (Cohen et al., 2001; Hu et al., 2001). Für den AR ist bekannt dass auch hier die Interaktion mit SMRT über dessen C-Terminus vermittelt wird (Dotzlaw et al., 2002). Für NCoR wurde ebenfalls bereits beschrieben, dass für diese Interaktion die CoRNR-Box-Motive notwendig sind (Cheng et al., 2002; Hodgson et al., 2005), allerdings wurde noch nicht gezeigt, dass

diese für die Interaktion ausreichen. Eine genauere Definition der minimalen Interaktionsdomänen ist allerdings weder für NCoR noch für SMRT in Bezug auf den AR beschrieben worden. In dieser Arbeit wurde versucht, durch Interaktionsstudien mittels des modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System die minimale Interaktionsdomäne mit dem AR im C-Terminus von SMRT zu charakterisieren. Hierbei zeigte bereits die Aufspaltung des C-Terminus in zwei Teile, die jeweils eine der CoRNR-Boxen enthalten, dass die Interaktion mit dem AR nicht mehr darstellbar war. Allerdings war das Konstrukt mit der ersten CoRNR-Box (VP16-SMRT-ID1) im selben Versuchssystem für die Identifizierung einer Interaktion mit dem TR und RAR geeignet. Genauso war auch mit dem Fragment, das beide CoRNR-Boxen mit dem Bereich zwischen den Motiven enthält (VP16-SCoRNR1+2), eine Interaktion mit TR und RAR sichtbar. VP16-SCoRNR1+2 zeigte allerdings keine Interaktion mit dem AR. Es konnte mit diesem Konstrukt die für SMRT typische Hormon-unabhängige Aktivierung des MMTV-Promotors beobachtet werden. Dieser Effekt ist vermutlich auch unabhängig vom AR, da auf dem eingesetzten Promotor-Konstrukt auch der Transkriptionsfaktor Oct binden kann, welcher auch mit SMRT interagiert (Prefontaine et al., 1999). Die Deletionen von SMRT, welche lediglich die kurzen Bereiche um die CoRNR-Boxen umfassen (VP16-SCoRNR1 und VP16-SCoRNR2), zeigten mit keinem der analysierten KHRen eine Interaktion. Möglicherweise waren diese Konstrukte in diesem System nicht funktionell. Indes scheint es unwahrscheinlich, dass noch kleinere Motive für die Bindung an den AR ausreichen, wenn die größeren Bereiche schon ungenügend waren. Vorstellbar wäre, dass VP16-SMRTID2 noch den minimalen mit dem AR interagierenden Bereich enthält, da dieses Konstrukt im modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System auch keine Interaktion mit dem TR oder dem RAR zeigte.

In dieser Arbeit wurde eine minimale Interaktionsdomäne mit dem AR gesucht, um einen neuen, AR-spezifischen CoR zu generieren. Da in dem bekannten CoR SMRT die Identifizierung einer kleineren Bindedomäne nicht möglich war wurde nach ganz neuen Interaktionssequenzen gesucht. In einem Peptidaptamer-Screen in Hefen wurden mehrere mit dem AR Hormon-abhängig interagierende Peptid-Motive gefunden. Interessanterweise konnte bei einer Datenbankrecherche für keine der isolierten Sequenzen eine Homologie mit bekannten Proteindomänen gefunden werden. Das bedeutet, dass über diesen Weg tatsächlich vollkommen neue

Interaktionsmotive isoliert werden konnten, welche eventuell andere Eigenschaften als die bekannten CoR aufweisen. Allerdings enthält das Peptidaptamer 513 ein LXXLL-Motiv, welches in CoAen die Interaktion mit KHRen vermitteln kann. In dieser Arbeit genauer analysierten Peptidaptamer 524 befindet sich eine CoRNR-Box-ähnliche Sequenz (IXXXIXXXL). Die meisten dieser Peptidaptamere zeigten auch in den Säuger-Zellen CV-1 eine Hormon-abhängige Bindung an den AR. Auffällig war, dass für keines der kleinen Motive im modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-System die Interaktionsfläche mit dem AR weiter eingeschränkt werden konnte. Weder mit dem N- noch mit dem C-terminalen Teil konnte eine Interaktion gemessen werden. Interessanterweise konnte eine andere Forschergruppe, die von mit dem AR interagierende Peptide berichteten, eine funktionelle Interaktion auch nur für den vollständigen Rezeptor darstellen (Kazmin et al., 2006). Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass für eine nachweisbare Bindung kleiner Peptide an den AR sowohl der N- als auch der C-Terminus erforderlich sind. Für das ausgewählte Peptidaptamer 524 war diese Interaktion nicht nur für den MMTV- sondern auch für den PSA-Promotor detektierbar. Dieses Resultat war von besonderer Wichtigkeit, denn die Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen wurden bereits als Promotor-selektiv beschrieben (Polly et al., 2000). Sollte das therapeutische Peptid (T-Pep 524) zu dem Zeitpunkt Wachstums-hemmend in die Therapie des Prostatakarzinoms eingreifen, an dem die Proliferation Androgen-unabhängig wird, so wäre es wichtig, dass dieses neue Molekül auch mit eventuell entstandenen Mutationen des Rezeptors interagiert. Eine Mutation des ARs, die relativ häufig identifiziert wurde ist eine Mutation in der LBD des Rezeptors. Für diesen mutierten Rezeptor, AR<sub>T877A</sub>, konnte ebenfalls eine Interaktion mit dem Peptidaptamer 524 gezeigt werden. Darüber hinaus ist besonders hervorzuheben, dass das neue Bindemotiv spezifisch mit dem AR und nicht mit den AR-verwandten KHRen GR $\alpha$ , PR1 oder PR2 interagiert. So kann erreicht werden, dass der neue CoR selektiv die Aktivität des AR hemmt und keine anderen Hormon-vermittelten Signale verändert.

Ein weiterer interessanter Punkt bei der Identifikation der mit dem AR interagierenden Peptidaptamere war, dass auffällig viele der isolierten Sequenzen mit einem vorzeitigen Stopp-Codon endeten (Tabelle 4-4). Das kurze Peptidaptamer ist für eine stabilere Konformation im aktiven *Loop* des *E. coli* TrxA-Gens integriert (Kapitel 2.4 und Abbildung 2-3). Das vorzeitige Stopp-Codon verhindert also auch die



Expression des C-terminalen TrxA-Abschnitts. Diese Daten könnten die Vermutung bestätigen, dass möglicherweise das Vorhandensein des TrxA-C-Terminus eine Interaktion mit dem AR eher behindert.

Auch in einem weiteren Peptidaptamer-Screen in Hefe, der in Gegenwart des Antihormons CPA durchgeführt wurde, sind in einigen Sequenzen Stopp-Codons aufgetreten (Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt). Auch das Peptidaptamer 524 endet vor dem Übergang in den hinteren Teil von TrxA.

### **5.3 T-Pep 524 ist ein neuer spezifischer CoR für den AR**

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Fusion aus dem Peptidaptamer 524 mit der reprimierenden Funktion von SUMO<sub>G97A</sub> zur Konstruktion eines neuen CoR geführt hat. Das so entstandene T-Pep 524 kann die Transaktivierung des AR hemmen. Besonders kennzeichnend ist, dass es in Folge dessen zu einer Hemmung des Wachstums der Prostatakrebszelllinie LNCaP und zu einer verringerten Expression des AR-Zielgens PSA kommt. In Interaktionsstudien mittels des modifizierten Säuger-Zwei-Hybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass das Peptidaptamer 524 spezifisch an den AR, jedoch nicht an die KHren PR1, PR2 oder GR $\alpha$  bindet. Das könnte auf eine ausschließliche Wirkung von T-Pep 524 auf den AR und damit auf AR-abhängig wachsende Zellen hinweisen. Dieser Effekt wäre für den potenziellen Einsatz von T-Pep 524 in der Prostatakrebstherapie sehr vorteilhaft, denn so könnten Nebenwirkungen des CoR auf andere, gesunde Zellen vermieden werden. Auch die CoRen NCoR und SMRT hemmen die Transaktivierung des ARs und die Expression von AR-Zielgenen (Dotzlaw et al., 2002; Dotzlaw et al., 2003) (Goeman und Baniahmad, 2004). Allerdings fungieren beide auch als CoRen für andere KHren sowie andere Transkriptionsfaktoren (Chen and Evans, 1995; Chen and Li, 1998; Jayne et al., 2006; Polo et al., 2004; Yan et al., 2004) und wären somit für Therapiezwecke in dieser Form ungeeignet, um zum Beispiel ein unausgeglichenes CoR-CoA-Verhältnis aufzuheben.

#### **5.4 Die Möglichkeiten der Peptidtherapie**

Die Peptidtherapie ist ein neuer Ansatz in der Behandlung von Krebserkrankungen. Wichtig ist, dass bekannt ist, welcher Faktor bzw. welche Faktoren für das ungehinderte Wachstum der Krebszellen verantwortlich sind.

Der Faktor oder das sog. *Drug Target* in der Prostatakrebstherapie ist der AR. Blockiert man die Aktivität des Rezeptors durch die Hemmung der körpereigenen testikulären Androgensynthese oder durch die Gabe von Antihormonen (Androgen-Antagonisten), so erreicht man eine Reduktion der Zellproliferation (Fuhrmann et al., 1998). Auch die Herunterregulierung der Expression des Rezeptors selbst führt, sogar bei bereits gegenüber den Hormontherapien resistenten Zellen, zur Blockierung der Zellproliferation (Liao et al., 2005). Damit stellt der AR das zentrale *Drug Target* dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Antihormon-vermittelte Interaktion von CoR mit dem AR eine wesentliche Rolle in der Antihormontherapie spielt. Die Überexpression der CoRen Alien $\alpha$  und SMRT führte in der Prostatakrebszelllinie LNCaP zu einer Wachstumshemmung. Im Fall von Alien $\alpha$  wirkte die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Antihormon CPA zu einer gegenseitigen Verstärkung der Wachstums-hemmenden Effekte. Ebenso verlangsamte auch der neue CoR T-Pep 524 die Proliferation dieser Zelllinie. Auch hier erhöhte sich die Hemmung in Gegenwart von CPA. Verschiedene Dinge haben einen Einfluss auf die erfolgreiche Antihormontherapie. Hierbei sind die Überexpression des AR, Mutationen im Rezeptor, ein Ungleichgewicht der Expression von CoAen gegenüber CoRen und der Verlust der Interaktion zwischen CoR und AR durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen in der Zelle zu nennen (Gregory et al., 2001; Liu et al., 2002; Matias et al., 2002; Taplin et al., 1999; Veldscholte et al., 1990; Visakorpi et al., 1995). Der Einsatz von T-Pep 524 in einer Peptidtherapie könnte geeignet sein, ein Überangebot an Rezeptormolekülen besser zu blockieren. Auch das Ungleichgewicht von CoAen gegenüber CoRen könnte durch T-Pep 524 wieder ins Gleichgewicht gebracht oder sogar in Richtung der hemmenden CoRen verschoben werden und somit zu einer effizienten und gezielten Hemmung des AR führen. Ob der synthetische CoR auch den Einflüssen der Signaltransduktionswegen gegenüber resistent ist, muss noch gezeigt werden.

Für eine erfolgreiche Peptidtherapie sind verschiedene Eigenschaften des Peptids zu berücksichtigen. Wichtig ist zum einen eine stabile Konformation des Peptids. Die hier verwendeten Peptidaptamere sind zu diesem Zweck in den aktiven *Loop* des *E. coli* TrxA-Proteins integriert. Dieses Protein hat eine sehr stabile Konformation und hält somit auch das integrierte Aptamer stabil. Das in dieser Arbeit ausgewählte Peptidaptamer 524 enthält nur den N-terminalen Teil von TrxA. Geschickterweise wurde der Faktor SUMO, der hier an sich als Repressionsdomäne an das Peptidaptamer 524 fusioniert wurde, ebenfalls als stabilisierendes Molekül beschrieben, welches die intrazelluläre Beständigkeit von kleinen Peptiden fördert (Roisin et al., 2004). An SUMO fusionierte Peptide beeinträchtigten in diesen Experimenten die Funktion des endogenen SUMO nicht. Wichtig ist auch, dass in diesem Zusammenhang keine cytotoxischen Effekte beobachtet wurden (Roisin et al., 2004).

Für den Transport von therapeutischen Peptiden in die Zellen werden hauptsächlich die folgenden Möglichkeiten diskutiert. Die als effizienteste Methode beschriebene Alternative ist die Fusion des Peptids an eine Proteintransduktionsdomäne (PTD). Als PTDs werden u. a. Domänen aus Antennapedia (aus *Drosophila*), VP22 (aus Herpes simplex) und TAT (aus HIV) oder eine simple Abfolge von Argininen oder Lysinen eingesetzt (Elliott and O'Hare, 1997; Frankel and Pabo, 1988; Green and Loewenstein, 1988; Prochiantz, 2000; Wender et al., 2000). Mechanistisch werden an PTDs fusionierte Peptide über Endosomen in die Zellen aufgenommen (Richard et al., 2003). Dieser Prozess (*Lipid-raft-dependent Macro-Pinocytosis*) ist unabhängig von Rezeptoren oder Transportmolekülen (Fittipaldi et al., 2003; Foerg et al., 2005; Wadia et al., 2004). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die so in die Zellen eingeschleusten Peptide, sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern, funktionell aktiv sind. In dem beschriebenen Beispiel wurde ein an TAT fusioniertes Peptid, das an die BCL6 BTB-Domäne bindet, in Lymphomzellen eingebracht und sorgte dort, durch die Blockade der Interaktionsdomäne für CoRen, für die Reaktivierung von BCL6-regulierten Genen (Polo et al., 2004). Auch *in vivo* Studien mit Mäusen haben gezeigt, dass intraperitoneale Injektionen eines  $\beta$ -domain-TAT Fusionsproteins zur partiellen Regression von implantierten Nierentumoren führen konnte (Datta et al., 2001).  $\beta$ -domain-TAT hemmt die IGF-1-vermittelten Signale, die für das Wachstum dieser Tumoren essentiell sind. Eine andere Wahlmöglichkeit ist die Liposomen-vermittelte Aufnahme von Peptiden in Zellen. Hier bilden die Peptide

---

nicht-kovalente Komplexe mit Liposomen und werden über einen Endozytose-unabhängigen Weg in Zellen aufgenommen (Borghouts et al., 2005). Besonders stabile Liposomen sind die sog. STEALTH-Liposomen, die durch den Einbau von Polyethylenglykol-derivatisierten Liposomen vor der phagozytotischen *Clearence* geschützt werden. Mit Doxorubicin beladene STEALTH-Liposomen fanden bereits erfolgreich Anwendung in der Behandlung von Brustkrebs und anderen soliden Tumoren (Borghouts et al., 2005; O'Shaughnessy, 2003; Robert et al., 2004; Rose, 2005). Schließlich besteht noch die Möglichkeit, diese Liposomen an Antikörper zu koppeln. Dadurch könnten die mit den Liposomen komplexierten Peptide über die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren direkt an spezifische Zielzellen dirigiert werden.

Welche der Methoden für den Transport von T-Pep 524 am Besten geeignet wäre, müsste man zunächst in Zellkulturversuchen evaluieren.

## 5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger CoR hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene, in einem Peptidaptamer-Screen isolierte Peptide auch in Säugerzellen mit dem humanen AR interagieren. Diese kleinen Bindedomänen wurden genutzt, um durch die Fusion an eine Repressionsdomäne, einen CoR zu generieren, der möglicherweise als therapeutisches Peptid (T-Pep) in der Prostatakrebstherapie eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse stellen die Fähigkeit von T-Pep 524, die Transaktivierung des AR zu hemmen, dar. Des Weiteren erfolgten durch die Interaktion von T-Pep 524 mit dem AR auch die Hemmung des Wachstums der Prostatakrebszelllinie LNCaP und die verminderte Expression des AR-regulierten PSA-Gens. Es wäre nun sehr interessant zu untersuchen, wie die Repression der AR-Aktivität mechanistisch funktioniert. Von besonderem Interesse wäre hierbei, welche weiteren Proteine rekrutiert werden, die für die Hemmung der Genexpression durch SUMO<sub>G97A</sub> sorgen. Im speziellen stellt sich die Frage, ob daran HDACs oder HMTs beteiligt sind. Würden durch die Rekrutierung von HMTs, die Histone an den Promotoren oder Enhancern Wachstums-relevanter Zielgene methyliert, könnte das sogar zu einer relativ dauerhaften Hemmung der Genexpression führen. Mittels Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIPs) könnte man analysieren, welche Faktoren zur selben Zeit an den Gen-regulierenden Sequenzen gebunden sind, wie AR und T-Pep 524. Man könnte mit derselben Methode überprüfen, ob und welche Chromatinmodifikationen durch die Interaktion zwischen AR und T-Pep 524 stattfinden, die dann zu einer veränderten Transkriptionsrate führen.

Bisher ist noch unbekannt, ob der AR auf die Metastasierung von Tumoren einen Einfluss hat. Ebenso ist unklar, ob auch auf diese Eigenschaft von Krebszellen, die Antihormontherapie und CoRen einen Effekt haben können. Es gibt Versuchskits, bei denen Zellen auf eine mit extrazellulärer Matrix beschichtete Membran gegeben werden. Zur Auswertung werden die durch die Membran gelangten Zellen ausgezählt. Hierbei gibt die Anzahl der Zellen eine Auskunft über den Metastasierungsgrad der Zellen. Die stabil mit T-Pep 524 transfizierten Zellen könnten in einem solchen Assay eingesetzt werden und zeigen, ob T-Pep 524 die Metastasierung von LNCaP-Zellen hemmen kann.

---

Um einen Schritt näher an eine durchführbare Peptidtherapie zu gelangen, müsste nachgeprüft werden, ob entsprechend aufgereinigtes Peptid, fusioniert an eine PTD oder im Liposomenkomplex, in Zellen eingebracht werden kann und dort funktionell aktiv bleibt. Hätte man dies in Zellkulturen gezeigt, so könnte der nächste Schritt Tierversuche in Mäusen sein. Zum Beispiel könnten in Xenografts die Wirkung von T-Pep 524 auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren untersucht werden. Generell scheint der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zur Herstellung neuartiger CoR geeignet zu sein, auch für andere KHR-abhängige Tumore alternative Therapiewege zu beschreiten. Theoretisch steht mit der Peptidaptamerbibliothek eine riesige Quelle an möglichen Bindedomänen zur Verfügung. Eine weitere Alternative, die Peptidaptamere zu nutzen ist, nach solchen Molekülen zu suchen, die direkt durch die Bindung an bestimmte Domänen des zu blockierenden Proteins, dessen Funktion beeinträchtigen. Hierzu müsste allerdings eine weit höhere Zahl von Peptidaptameren untersucht werden. Außerdem könnte in diesem Fall eine andere Selektionsmethode nötig werden, wenn durch den Funktionsverlust das entsprechende Reporter-gen nicht mehr aktiviert werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

Altincicek, B., Tenbaum, S. P., Dressel, U., Thormeyer, D., Renkawitz, R., and Baniahmad, A. (2000). Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. *J Biol Chem* 275, 7662-7667.

Baldi, E., Bonaccorsi, L., and Forti, G. (2003). Androgen receptor: good guy or bad guy in prostate cancer invasion? *Endocrinology* 144, 1653-1655.

Balk, S. P. (2002). Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology* 60, 132-138; discussion 138-139.

Baniahmad, A. (2005). Nuclear hormone receptor co-repressors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 89-97.

Baniahmad, A., Kohne, A. C., and Renkawitz, R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *Embo J* 11, 1015-1023.

Baniahmad, A., Leng, X., Burriss, T. P., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995). The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol Cell Biol* 15, 76-86.

Baumann, C. T., Lim, C. S., and Hager, G. L. (1999). Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. *Cell Biochem Biophys* 31, 119-127.

Berrevoets, C. A., Umar, A., and Brinkmann, A. O. (2002). Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol* 198, 97-103.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Borghouts, C., Kunz, C., and Groner, B. (2005). Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 5, 783-797.

Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459-472.

Bray, F., Sankila, R., Ferlay, J., and Parkin, D. M. (2002). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38, 99-166.

Brinkmann, A. O., Blok, L. J., de Ruyter, P. E., Doesburg, P., Stekettee, K., Berrevoets, C. A., and Trapman, J. (1999). Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 307-313.

Brinkmann, A. O., and Trapman, J. (2000). Prostate cancer schemes for androgen escape. *Nat Med* 6, 628-629.

- Buerger, C., and Groner, B. (2003). Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 669-675.
- Buerger, C., Nagel-Wolfrum, K., Kunz, C., Wittig, I., Butz, K., Hoppe-Seyler, F., and Groner, B. (2003). Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *J Biol Chem* 278, 37610-37621.
- Burke, L. J., and Baniahmad, A. (2000). Co-repressors 2000. *Faseb J* 14, 1876-1888.
- Busch, K., Martin, B., Baniahmad, A., Martial, J. A., Renkawitz, R., and Muller, M. (2000). Silencing subdomains of v-ErbA interact cooperatively with corepressors: involvement of helices 5/6. *Mol Endocrinol* 14, 201-211.
- Butz, K., Denk, C., Fitscher, B., Crnkovic-Mertens, I., Ullmann, A., Schroder, C. H., and Hoppe-Seyler, F. (2001). Peptide aptamers targeting the hepatitis B virus core protein: a new class of molecules with antiviral activity. *Oncogene* 20, 6579-6586.
- Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. (2000). Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6693-6697.
- Callewaert, L., Van Tilborgh, N., and Claessens, F. (2006). Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res* 66, 543-553.
- Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 324, 1156-1161.
- Ceraline, J., Erdmann, E., Erbs, P., Deslandres-Cruchant, M., Jacqmin, D., Duclos, B., Klein-Soyer, C., Dufour, P., and Bergerat, J. P. (2003). A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol* 148, 99-110.
- Chamovitz, D. A., and Glickman, M. (2002). The COP9 signalosome. *Curr Biol* 12, R232.
- Chatterjee, B. (2003). The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* 253, 89-101.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Chen, J. D., and Li, H. (1998). Coactivation and corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 169-190.



- Cheng, S., Brzostek, S., Lee, S. R., Hollenberg, A. N., and Balk, S. P. (2002). Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 16, 1492-1501.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G., and Rombauts, W. (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 23-30.
- Cleutjens, K. B., van der Korput, H. A., Ehren-van Eekelen, C. C., Sikes, R. A., Fasciana, C., Chung, L. W., and Trapman, J. (1997). A 6-kb promoter fragment mimics in transgenic mice the prostate-specific and androgen-regulated expression of the endogenous prostate-specific antigen gene in humans. *Mol Endocrinol* 11, 1256-1265.
- Cleutjens, K. B., van Eekelen, C. C., van der Korput, H. A., Brinkmann, A. O., and Trapman, J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271, 6379-6388.
- Cohen, R. N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F. E., and Hollenberg, A. N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol* 15, 1049-1061.
- Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 23, 255-275.
- Corbin, A. (1982). From contraception to cancer: a review of the therapeutic applications of LHRH analogues as antitumor agents. *Yale J Biol Med* 55, 27-47.
- Craft, N., Shostak, Y., Carey, M., and Sawyers, C. L. (1999). A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 5, 280-285.
- Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., and Hobisch, A. (2002). Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 9, 155-170.
- Datta, K., Sundberg, C., Karumanchi, S. A., and Mukhopadhyay, D. (2001). The 104-123 amino acid sequence of the beta-domain of von Hippel-Lindau gene product is sufficient to inhibit renal tumor growth and invasion. *Cancer Res* 61, 1768-1775.
- Diamandis, E. P. (1998). Prostate-specific antigen or human kallikrein 3? Recent developments. *Tumour Biol* 19, 65-67; discussion 67-68.
- Dotzlaw, H., Moehren, U., Mink, S., Cato, A. C., Iniguez Lluhi, J. A., and Baniahmad, A. (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol* 16, 661-673.

- Dotzlaw, H., Papaioannou, M., Moehren, U., Claessens, F., and Baniahmad, A. (2003). Agonist-antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 213, 79-85.
- Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R., and Baniahmad, A. (1999). Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19, 3383-3394.
- Eckey, M., Hong, W., Papaioannou, M., and Baniahmad, A. (2007). The nucleosome assembly activity of NAP1 is enhanced by Alien. *Mol Cell Biol*.
- Elliott, G., and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Fabbrizio, E., Le Cam, L., Polanowska, J., Kaczorek, M., Lamb, N., Brent, R., and Sardet, C. (1999). Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity. *Oncogene* 18, 4357-4363.
- Faus, H., and Haendler, B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60, 520-528.
- Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H. S., Eng, F., Bertos, N. R., Pelletier, N., *et al.* (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* 11, 139-150.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* 278, 34141-34149.
- Foerg, C., Ziegler, U., Fernandez-Carneado, J., Giralt, E., Rennert, R., Beck-Sickingler, A. G., and Merkle, H. P. (2005). Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape. *Biochemistry* 44, 72-81.
- Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.
- Fu, M., Wang, C., Reutens, A. T., Wang, J., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantaggiati, M. L., and Pestell, R. G. (2000). p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275, 20853-20860.

- Fu, M., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Sakamaki, T., Yeung, Y. G., Chang, C., Hopp, T., Fuqua, S. A., Jaffray, E., *et al.* (2002). Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol Cell Biol* 22, 3373-3388.
- Fuhrmann, U., Parczyk, K., Klotzbucher, M., Klocker, H., and Cato, A. C. (1998). Recent developments in molecular action of antihormones. *J Mol Med* 76, 512-524.
- Gast, A., Schneikert, J., and Cato, A. C. (1998). N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 117-123.
- Georget, V., Lobaccaro, J. M., Terouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J. C., and Sultan, C. (1997). Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 129, 17-26.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Goeman, F. & Baniahmad, A. (2004). Mechanisms of nuclear hormone receptor signaling. Erschienen in: *Mechanisms of Signal Transduction and Inducible Gene Expression*, Research Signpost, ISBN: 81-7736-162-7; 53-76.
- Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., and Baniahmad, A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* 25, 422-431.
- Green, M., and Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179-1188.
- Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61, 4315-4319.
- Guenther, M. G., Lane, W. S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M. A., and Shiekhhattar, R. (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* 14, 1048-1057.
- Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V. D., *et al.* (2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 10, 309-319.
- Hara, T., Miyazaki, J., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., and Miyamoto, M. (2003). Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res* 63, 149-153.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.

He, M. L., Jiang, A. L., Zhang, P. J., Hu, X. Y., Liu, Z. F., Yuan, H. Q., and Zhang, J. Y. (2005). Identification of androgen-responsive element ARE and Sp1 element in the maspin promoter. *Chin J Physiol* 48, 160-166.

Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., *et al.* (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.

Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M., and Dubiel, W. (1999). Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid'. *Mol Biol Rep* 26, 29-34.

Hodgson, M. C., Astapova, I., Cheng, S., Lee, L. J., Verhoeven, M. C., Choi, E., Balk, S. P., and Hollenberg, A. N. (2005). The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *J Biol Chem* 280, 6511-6519.

Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114, 193-197.

Hoppe-Seyler, F., and Butz, K. (2000). Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine. *J Mol Med* 78, 426-430.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hu, X., Li, Y., and Lazar, M. A. (2001). Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21, 1747-1758.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.

Jayne, S., Zwartjes, C. G., van Schaik, F. M., and Timmers, H. T. (2006). Involvement of the SMRT/NCoR-HDAC3 complex in transcriptional repression by the CNOT2 subunit of the human Ccr4-Not complex. *Biochem J* 398, 461-467.

Jaynes, J. B., and O'Farrell, P. H. (1991). Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *Embo J* 10, 1427-1433.

Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V., and Koprowski, H. (1964). Infection Of Human And Simian Tissue Cultures With Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52, 53-59.

- Jenster, G., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 293 (Pt 3), 761-768.
- Jenster, G., van der Korput, H. A., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1995). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270, 7341-7346.
- Jenster, G., van der Korput, H. A., 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.
- Jones, P. L., Sachs, L. M., Rouse, N., Wade, P. A., and Shi, Y. B. (2001). Multiple N-CoR complexes contain distinct histone deacetylases. *J Biol Chem* 276, 8807-8811.
- Kamitani, T., Nguyen, H. P., and Yeh, E. T. (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J Biol Chem* 272, 14001-14004.
- Kazmin, D., Prytkova, T., Cook, C. E., Wolfinger, R., Chu, T. M., Beratan, D., Norris, J. D., Chang, C. Y., and McDonnell, D. P. (2006). Linking ligand-induced alterations in androgen receptor structure to differential gene expression: a first step in the rational design of selective androgen receptor modulators. *Mol Endocrinol* 20, 1201-1217.
- Kuil, C. W., Berrevoets, C. A., and Mulder, E. (1995). Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J Biol Chem* 270, 27569-27576.
- Labrie, C., Simard, J., Zhao, H. F., Belanger, A., Pelletier, G., and Labrie, F. (1989). Stimulation of androgen-dependent gene expression by the adrenal precursors dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 124, 2745-2754.
- Labrie, F., Belanger, A., Dupont, A., Luu-The, V., Simard, J., and Labrie, C. (1993). Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin Invest Med* 16, 475-492.
- Labrie, F., Dupont, A., Giguere, M., Borsanyi, J. P., Lacourciere, Y., Monfette, G., Emond, J., and Bergeron, N. (1988). Benefits of combination therapy with flutamide in patients relapsing after castration. *Br J Urol* 61, 341-346.
- Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R., and Moore, D. D. (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 243-254.
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J., and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J* 19, 4342-4350.

- Liao, X., Tang, S., Thrasher, J. B., Griebeling, T. L., and Li, B. (2005). Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 4, 505-515.
- Lieberman, R., Bermejo, C., Akaza, H., Greenwald, P., Fair, W., and Thompson, I. (2001). Progress in prostate cancer chemoprevention: modulators of promotion and progression. *Urology* 58, 835-842.
- Liu, L., Yoon, J. H., Dammann, R., and Pfeifer, G. P. (2002). Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 21, 6835-6840.
- Mai, J. C., Shen, H., Watkins, S. C., Cheng, T., and Robbins, P. D. (2002). Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* 277, 30208-30218.
- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., *et al.* (2000). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60, 944-949.
- Mathur, M., Tucker, P. W., and Samuels, H. H. (2001). PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21, 2298-2311.
- Matias, P. M., Carrondo, M. A., Coelho, R., Thomaz, M., Zhao, X. Y., Wegg, A., Crusius, K., Egner, U., and Donner, P. (2002). Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (AR(ccr)) derived from an androgen-independent prostate cancer. *J Med Chem* 45, 1439-1446.
- Metzger, E., Muller, J. M., Ferrari, S., Buettner, R., and Schule, R. (2003). A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *Embo J* 22, 270-280.
- Moehren, U., Dressel, U., Reeb, C. A., Vaisanen, S., Dunlop, T. W., Carlberg, C., and Baniahmad, A. (2004). The highly conserved region of the co-repressor Sin3A functionally interacts with the co-repressor Alien. *Nucleic Acids Res* 32, 2995-3004.
- Moehren, U., Papaioannou, M., Reeb, C. A., Hong, W., and Baniahmad, A. (2007). Alien interacts with the human androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Mol Endocrinol*.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- O'Shaughnessy, J. A. (2003). Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4, 318-328.
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H., and Cato, A. C. (1999). Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18, 6322-6329.

- Polly, P., Herdick, M., Moehren, U., Baniahmad, A., Heinzl, T., and Carlberg, C. (2000). VDR-Alien: a novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership. *Faseb J* 14, 1455-1463.
- Polo, J. M., Dell'Oso, T., Ranuncolo, S. M., Cerchietti, L., Beck, D., Da Silva, G. F., Prive, G. G., Licht, J. D., and Melnick, A. (2004). Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat Med* 10, 1329-1335.
- Potter, G. B., Beaudoin, G. M., 3rd, DeRenzo, C. L., Zarach, J. M., Chen, S. H., and Thompson, C. C. (2001). The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 15, 2687-2701.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14145-14150.
- Prefontaine, G. G., Walther, R., Giffin, W., Lemieux, M. E., Pope, L., and Hache, R. J. (1999). Selective binding of steroid hormone receptors to octamer transcription factors determines transcriptional synergism at the mouse mammary tumor virus promoter. *J Biol Chem* 274, 26713-26719.
- Prochiantz, A. (2000). Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* 12, 400-406.
- Protopopov, A. I., Li, J., Winberg, G., Gizatullin, R. Z., Kashuba, V. I., Klein, G., and Zabarovsky, E. R. (2002). Human cell lines engineered for tetracycline-regulated expression of tumor suppressor candidate genes from a frequently affected chromosomal region, 3p21. *J Gene Med* 4, 397-406.
- Renaud, J. P., and Moras, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* 57, 1748-1769.
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278, 585-590.
- Robert, N. J., Vogel, C. L., Henderson, I. C., Sparano, J. A., Moore, M. R., Silverman, P., Overmoyer, B. A., Shapiro, C. L., Park, J. W., Colbern, G. T., *et al.* (2004). The role of the liposomal anthracyclines and other systemic therapies in the management of advanced breast cancer. *Semin Oncol* 31, 106-146.
- Roche, P. J., Hoare, S. A., and Parker, M. G. (1992). A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 6, 2229-2235.
- Roisin, A., Robin, J. P., Dereuddre-Bosquet, N., Vitte, A. L., Dormont, D., Clayette, P., and Jalinot, P. (2004). Inhibition of HIV-1 replication by cell-penetrating peptides binding Rev. *J Biol Chem* 279, 9208-9214.
- Rose, P. G. (2005). Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. *Oncologist* 10, 205-214.

Roy, A. K., Lavrovsky, Y., Song, C. S., Chen, S., Jung, M. H., Velu, N. K., Bi, B. Y., and Chatterjee, B. (1999). Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 55, 309-352.

Sack, J. S., Kish, K. F., Wang, C., Attar, R. M., Kiefer, S. E., An, Y., Wu, G. Y., Scheffler, J. E., Salvati, M. E., Krystek, S. R., Jr., *et al.* (2001). Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4904-4909.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.

Schwechheimer, C., and Deng, X. W. (2001). COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 11, 420-426.

Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M., and Dubiel, W. (1998). A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *Faseb J* 12, 469-478.

Shang, Y., Myers, M., and Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 9, 601-610.

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.

Taplin, M. E., and Balk, S. P. (2004). Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* 91, 483-490.

Taplin, M. E., Bubley, G. J., Ko, Y. J., Small, E. J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S. P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res* 59, 2511-2515.

Tenbaum, S., and Baniahmad, A. (1997). Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1325-1341.

Underhill, C., Qutob, M. S., Yee, S. P., and Torchia, J. (2000). A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem* 275, 40463-40470.



- Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H. C., Trapman, J., Brinkmann, A. O., and Mulder, E. (1990). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 534-540.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9, 401-406.
- Wadia, J. S., Stan, R. V., and Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10, 310-315.
- Wang, L., Hsu, C. L., and Chang, C. (2005). Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 63, 117-130.
- Wee, S., Hetfeld, B., Dubiel, W., and Wolf, D. A. (2002). Conservation of the COP9/signalosome in budding yeast. *BMC Genet* 3, 15.
- Wei, N., and Deng, X. W. (1999). Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet* 15, 98-103.
- Weigel, N. L., and Zhang, Y. (1998). Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* 76, 469-479.
- Wen, Y. D., Perissi, V., Staszewski, L. M., Yang, W. M., Krones, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Seto, E. (2000). The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7202-7207.
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13003-13008.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., and Axel, R. (1978). Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14, 725-731.
- Yan, M., Burel, S. A., Peterson, L. F., Kanbe, E., Iwasaki, H., Boyapati, A., Hines, R., Akashi, K., and Zhang, D. E. (2004). Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17186-17191.
- Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12, 63-74.

---

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Lazar, M. A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14400-14405.

Zegarra-Moro, O. L., Schmidt, L. J., Huang, H., and Tindall, D. J. (2002). Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 1008-1013.

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 U S A* 94, 5673-5678.

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-364.

Zilliacus, J., Holter, E., Wakui, H., Tazawa, H., Treuter, E., and Gustafsson, J. A. (2001). Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14-3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol Endocrinol* 15, 501-511.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin bei Aminosäuren
A	Ampere bei Stromstärke
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Ade2	Adenin-Selektionsgen
Amp	Ampicillin
ANTP	Antennapedia
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (alkalische Kälberdarm-phosphatase)
CoA(en)	Coaktivator(en)
CoR(en)	Coaktivatoren
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CMV	Cytomegalie-Virus
Da	Dalton [g/Mol]
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
f.l.	full length (gesamtes Protein)
g	Erdbeschleunigung [9,81 m/sec <sup>2</sup> ] bei Zentrifugationen
g	Gramm bei Gewicht
gal <sub>94</sub>	Aminosäuren 1-94 des Hefe-Gal4 Aktivators

---

GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes simplex Virus
Hyg	Hygromycin
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
k	kilo [10 <sup>3</sup> ]
kb	Kilobase (=1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
KHR(en)	Kernhormonrezeptor(en)
KT	Kalbsthymus
L	Leucin
l	Liter
lacZ	Gen für $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (Medium)
Lsg	Lösung
LMP	<i>Low Melting Point</i> (Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt)
Lys	Lysozym
m	milli [10 <sup>-3</sup> ]
M	Molar [mol/l]
MCS	Multiple Cloning Site (Multiple Klonierungsstelle)
MeOH	Methanol
min	Minuten
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
$\mu$	mikro [10 <sup>-6</sup> ]
n	nano [10 <sup>-9</sup> ]
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Ori	origin (Replikationsursprung)
P	Phosphorylierungsstelle
p	pico [10 <sup>-12</sup> ]
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffer Solution)
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PMSF	Phenylmethylsulfonsäureflourid
PolyA	Polyadenylierungssignal
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>

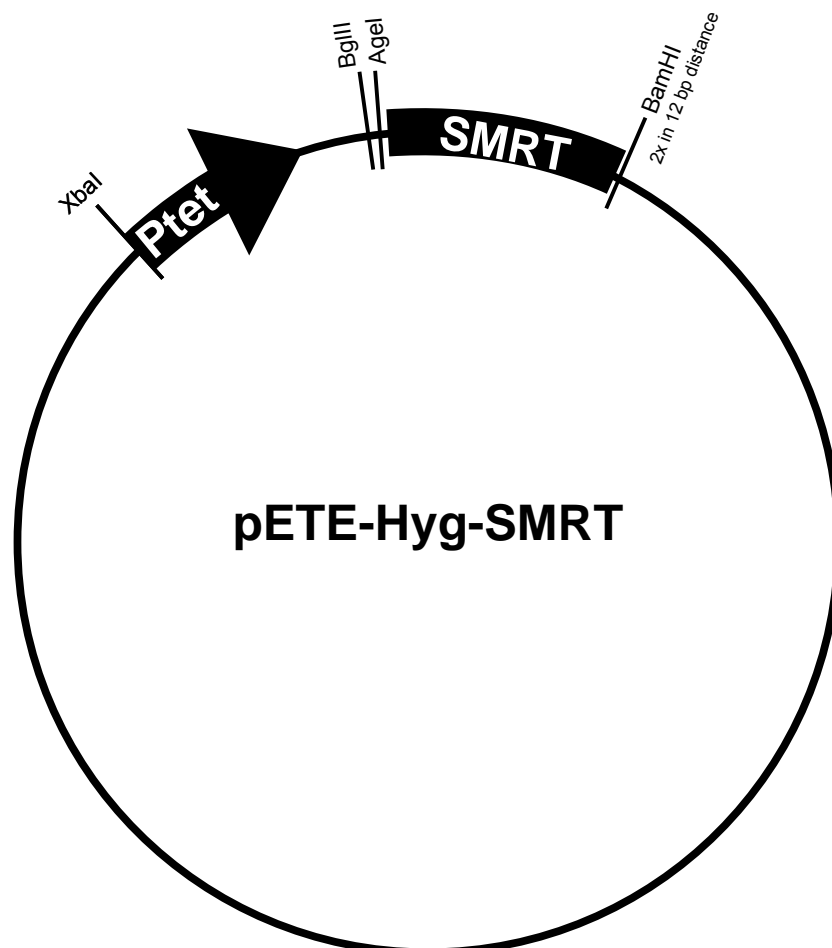
---

RAR	Retinsäurerezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RLU	relative light units (Relative Licht Einheiten)
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>Retinoic X Receptor</i>
S	SUMOylierungsstelle
sec	Sekunden
SHR	Steroidhormonrezeptor
Strep	Streptomycin
SV	Simian virus Promotor
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAT	<i>Transactivator of Transcription</i>
TATA	TATA-Box Promototr
TB	Teriffic Broth (Medium) oder Transformation buffer (Herstellung kompetenter Bakterien)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TELT	Tris-EDTA-LiCl-Triton Puffer
Tet	Tetrazyklin
tk	Thymidinkinase-Promotor
TR	Thyroidhormonrezeptor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Triton X-100	Oktylphenol-Ethelenglykolether
U	<i>Unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht (Wellenlänge < 340 nm)
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt (Spannung)
VP16	Herpes simplex Virus Protein 16
VT	Volumenteile
(v/v)	Volumenanteile
W	Watt (Leistung)
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Massenanteile
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Plasmidkarten der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide

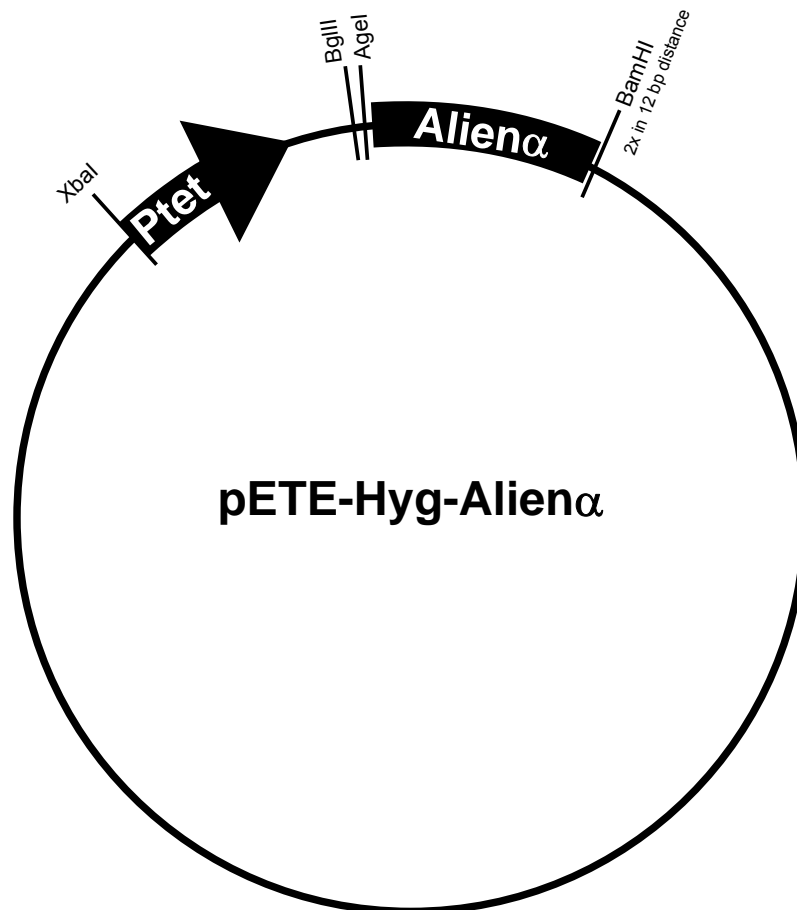
Klonierungsstrategie: pETE-Hyg wurde mit NotI (+ Klenow) verdaut (+ CIAP).  
pCMX-SMRT wurde mit NcoI und BamHI verdaut (beide + Klenow)

Selektion: Ampicillin, Hygromycin



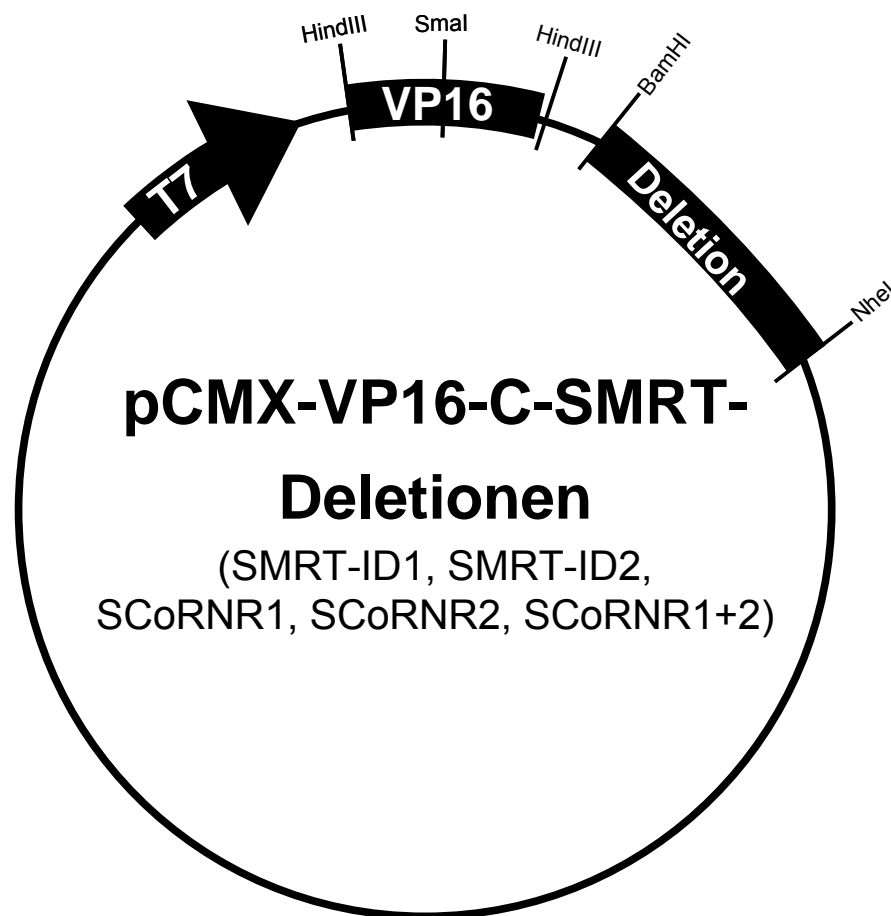
Klonierungsstrategie: pETE-Hyg wurde mit NotI (+ Klenow) verdaut (+ CIAP).  
pCDNA3-ATG-T15 wurde mit NcoI und XbaI (beide + Klenow) verdaut.

Selektion: Ampicillin, Hygromycin



Klonierungsstrategie: pCMX-VP16 wurde mit BamHI und NheI verdaut (+ CIAP).  
Die C-SMRT Deletionen wurden über PCR-amplifiziert (vom Vektor: pCMX-SMRT) und mit BamHI und NheI verdaut.

Selektion: Ampicillin

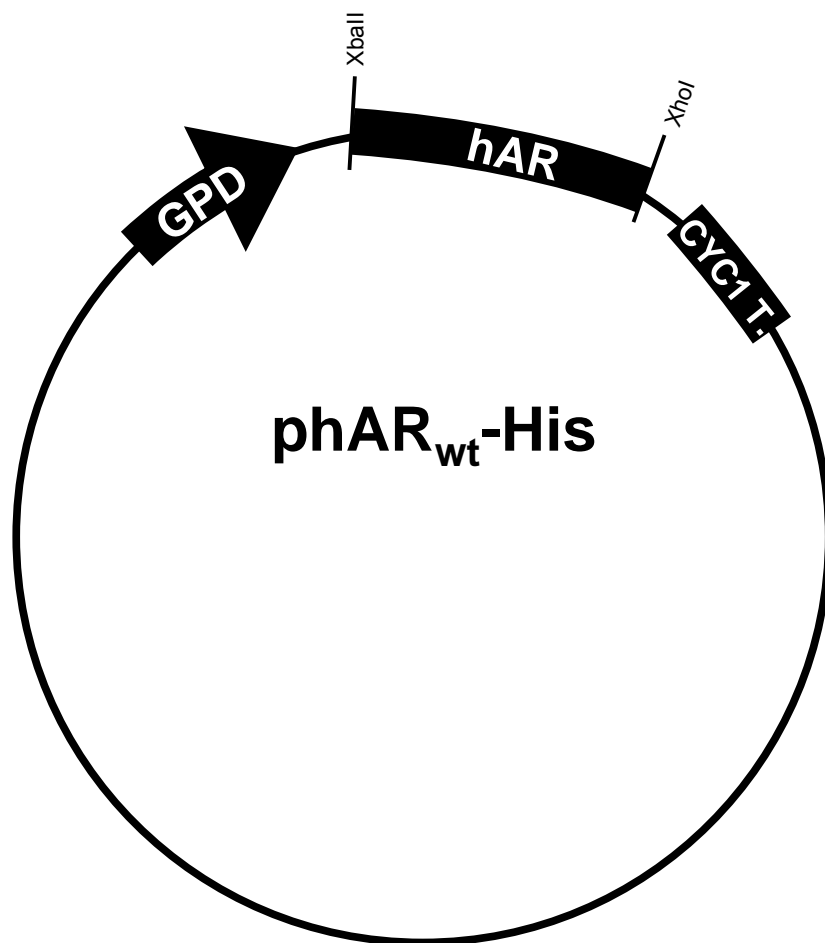




Klonierungsstrategie: p423GPD wurde mit XbaI und XhoI verdaut (+ CIAP).  
pAR<sub>wt</sub> wurde mit XbaI und XhoI verdaut.

Selektion: Ampicillin

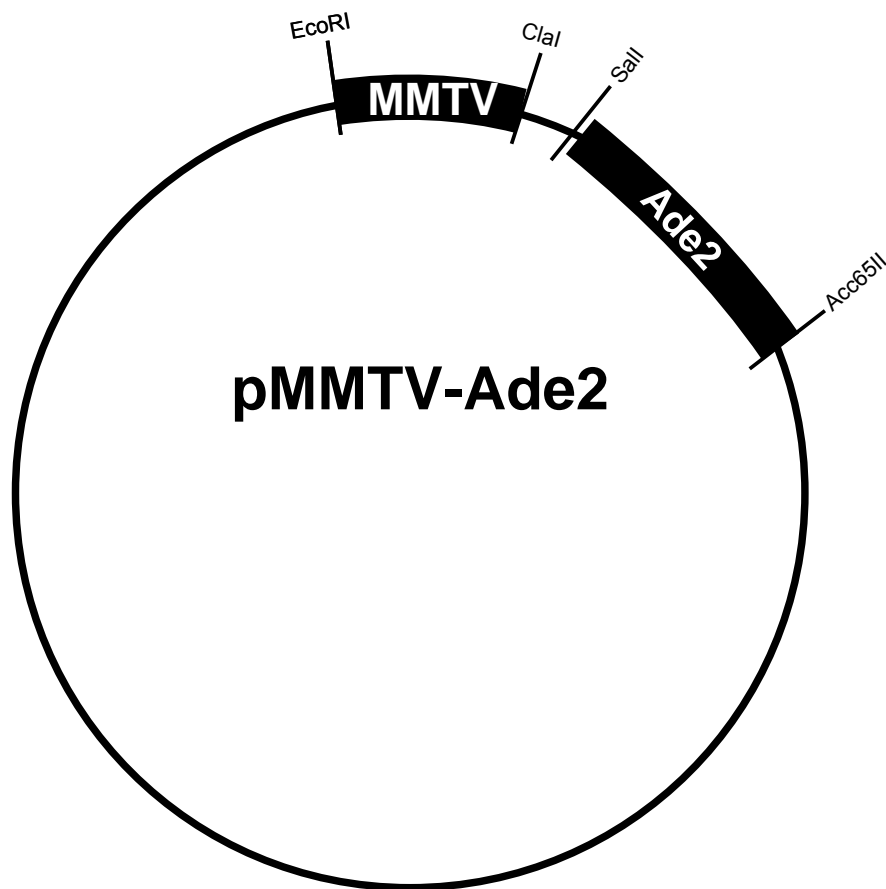
Selektionsmarker in Hefen: Histidin



Klonierungsstrategie: pRS/ARE-Ade2 wurde mit EcoRI und ClaI verdaut (+ CIAP).  
MMTV wurde über PCR amplifiziert (vom Vektor: pMMTV-luc) und mit  
EcoRI und ClaI verdaut.

Selektion: Ampicillin

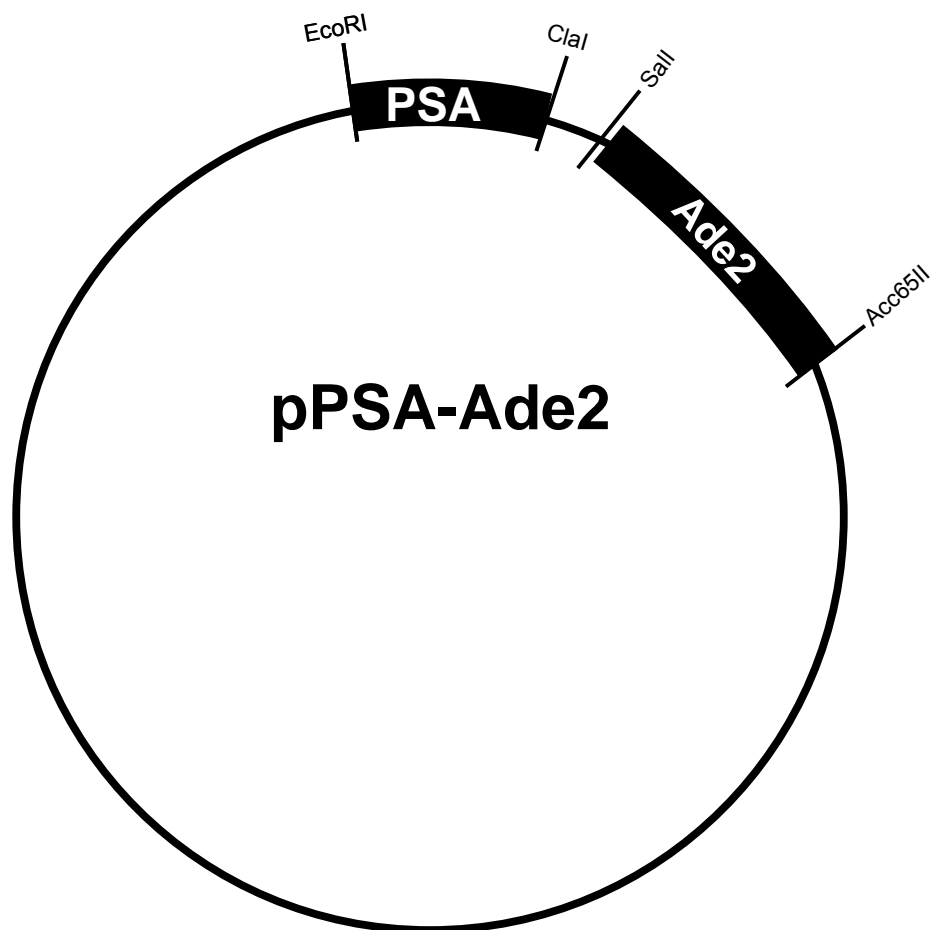
Selektionsmarker in Hefen: Uracil



Klonierungsstrategie: pRS/ADE-Ade2 wurde mit EcoRI und ClaI verdaut (+ CIAP).  
PSA wurde über PCR amplifiziert (vom Vektor: pPSA-luc) und mit  
EcoRI und ClaI verdaut.

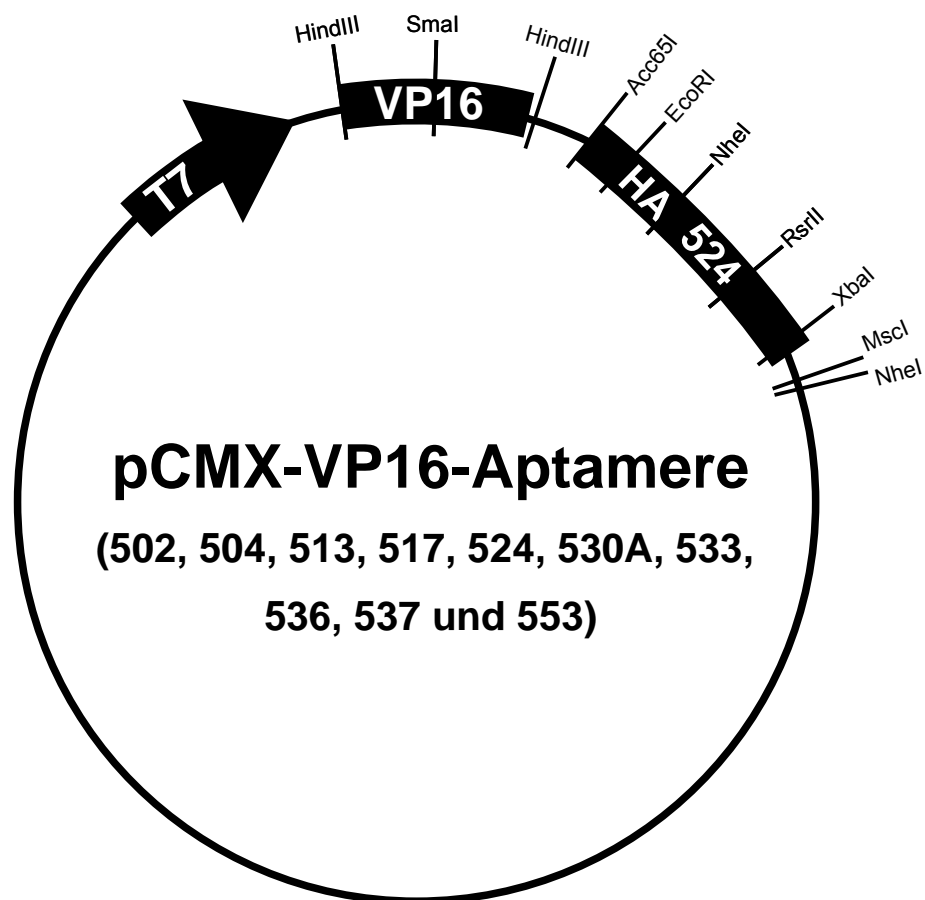
Selektion: Ampicillin

Selektionsmarker in Hefen: Uracil



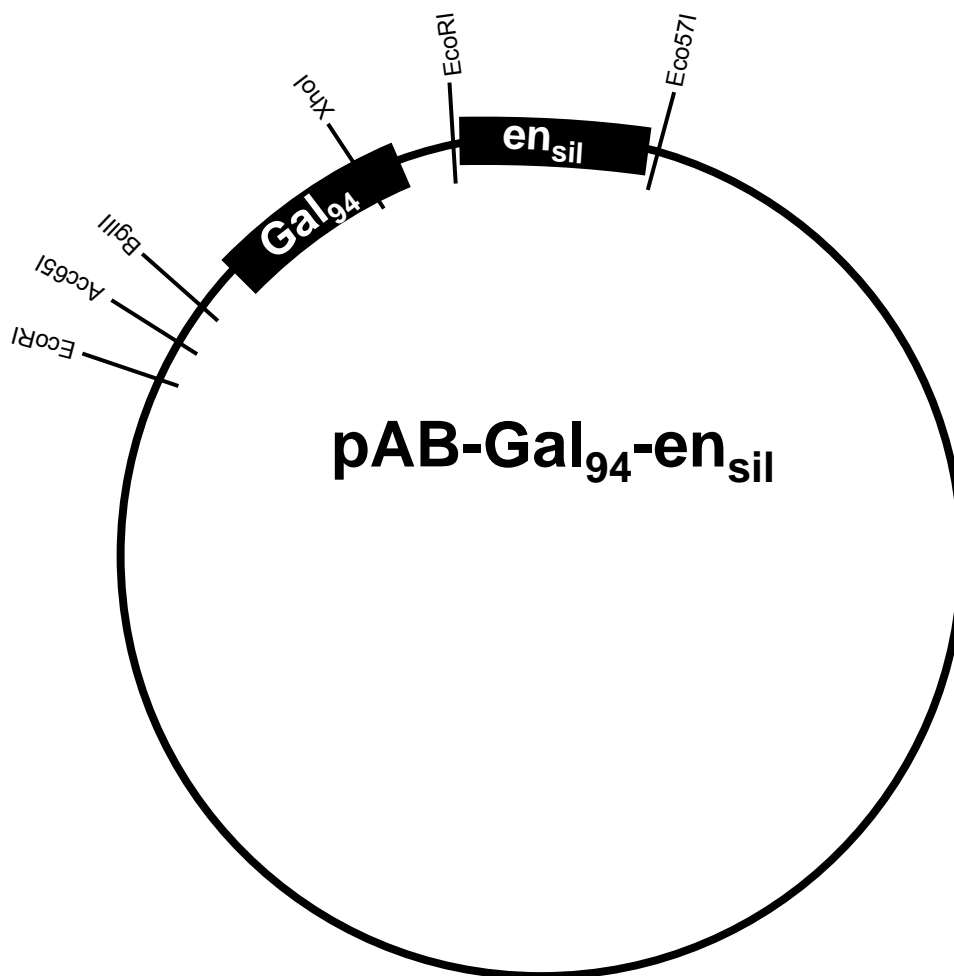
Klonierungsstrategie: pCMX-VP16 wurde mit *Acc65I* und *BamHI* verdaut (+ CIAP).  
Die Aptamere wurden über PCR direkt aus dem Hefeklon amplifiziert  
(Vektor: pAD-Trx) und mit *Acc65I* und *XbaI* verdaut.

Selektion: Ampicillin



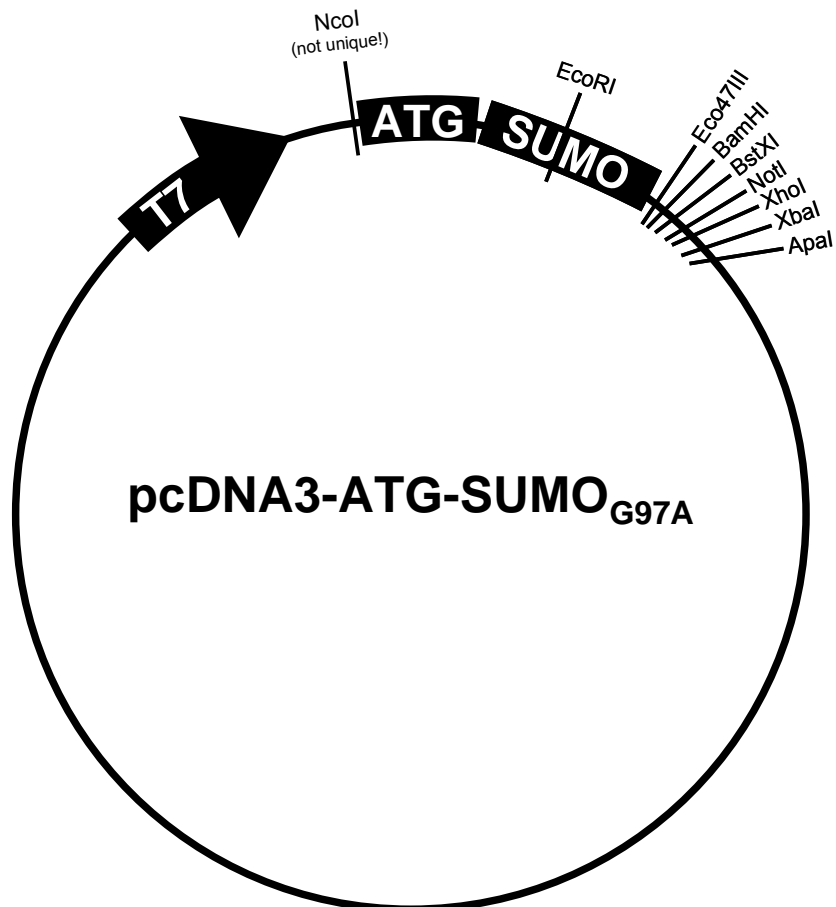
Klonierungsstrategie: pAB-Gal<sub>94</sub>-linker wurde mit Cfr9I (+ Klenow) und BamHI verdaut (+ CIAP).  
pSG424-en $\Delta$  wurde mit NaeI und BamHI verdaut.

Selektion: Ampicillin



Klonierungsstrategie: pCDNA3-ATG-linker wurde mit EcoRI verdaut (+ CIAP).  
SUMO<sub>G97A</sub> wurde über PCR-amplifiziert (Vektor: pABGal<sub>94</sub>-SUMO<sub>G97A</sub>)  
und mit MnlI verdaut.

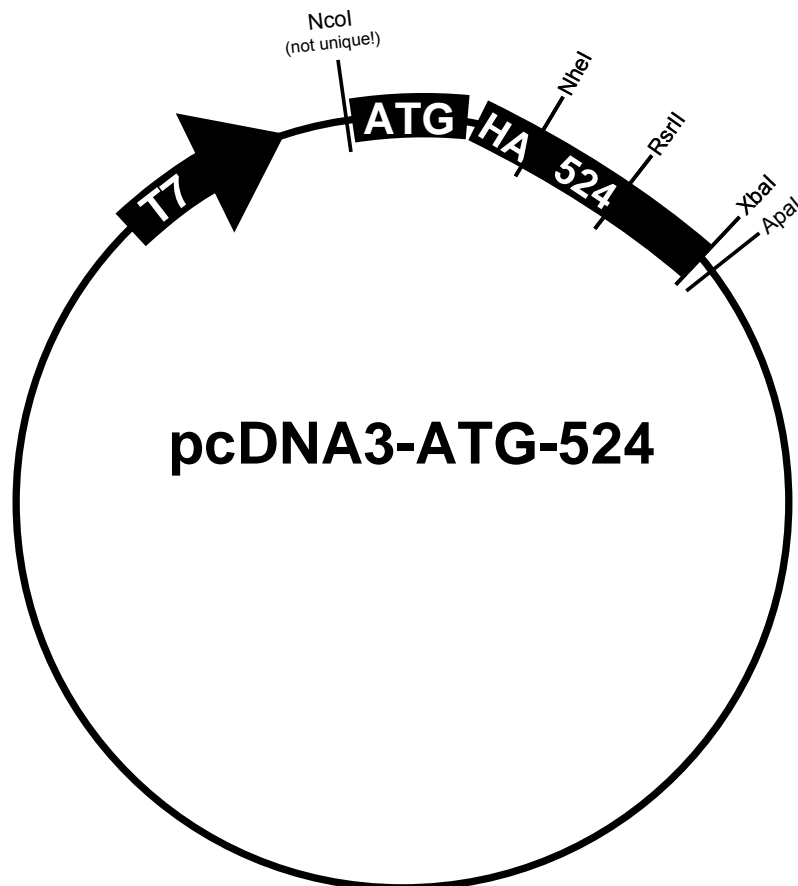
Selektion: Ampicillin, Neomycin



Klonierungsstrategie: pCDNA3-ATG-linker wurde mit Eco47III und XbaI verdaut (+ CIAP).  
pCMX-VP16-524 wurde mit EcoRI verdaut (+ Klenow) und mit XbaI verdaut.

Für die "in-frame" Klonierung wurde das neue Plasmid pCDNA3-ATG-524(-)  
mit EcoRI verdaut (+ Klenow) und religiert.

Selektion: Ampicillin, Neomycin



Klonierungsstrategie: pCDNA3-ATG-524(-) wurde mit EcoRI verdaut (+ CIAP).  
SUMO<sub>G97A</sub> wurde über PCR amplifiziert und mit MnlI verdaut.

Selektion: Ampicillin, Neomycin

