

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Funktion der Cochaperone FKBP51, FKBP52 und p23 bei der
Signaltransduktion der Corticoidrezeptoren**

Gabriela Monika Wochnik

aus

Beuthen

2004

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. F. Holsboer betreut und von PD Dr. H. Zorbas vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 13.04.2004

Gabriela Wochnik

Dissertation eingereicht am 13.04.2004

1.Gutachter: Prof. F. Holsboer

2.Gutachter: PD Dr. H. Zorbas

Mündliche Prüfung am: 12.08.2004

In der Wissenschaft gleichen wir alle den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton

Für Eric

Eine wissenschaftliche Entdeckung
ist nie die Arbeit von nur einer Person

Louis Pasteur

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Dr. T. Rein am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei **Prof. F. Holsboer** bedanken, daß er mir die Möglichkeit gab an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Darüber hinaus möchte ich ihm für die gelungenen Tiedersee-Meetings, seine Diskussionsbereitschaft und so manch aufmunterndes Wort danken.

Bei **Prof. F. U. Hartl** und **Dr. J. Young** möchte ich mich für die Unterstützung und die fachkundigen Ratschläge bei der Projektplanung sowie die große Diskussionsbereitschaft bedanken.

Dr. H. Zorbas danke ich sehr herzlich für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Dr. T. Rein danke ich für die Unterstützung bei den Experimenten, die Betreuung der Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und seinen Einsatz für die Arbeitsgruppe.

Dr. D. Spenger, Dr. C. Behl und Dr. O. Almeida danke ich sehr herzlich für verschiedene Plasmide und Zellen.

Bei **Dr. D. Vogt-Weisenhorn** und **Dr. A. Abel** (alias Guschtl) möchte ich mich für die Hilfe mit dem Fluoreszenzmikroskop und den Fluoreszenzexperimenten bedanken.

Dr. U. Schmidt (Ulli) hat durch entsprechende therapeutische Gespräche, Korrekturen der Manuskripte und viele interessante Diskussionen bei so mancher Tasse Kakao zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen anderen Gruppenmitgliedern und Mitstreitern im Labor möchte ich für das super Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken. Insbesondere **Bärbel, Andrea** und **Paul** möchte ich für die Wiederholung von so manchen Experiment danken.

Dr. E. Binder und **S. Papiol** danke ich herzlich für die Isolierung der Lymphozytenextrakte für die Western-Blot Untersuchung von FKBP51 im Rahmen des MARS Projekts.

Ganz herzlich bedanken möchte ich natürlich auch bei **meinen Eltern und Freunden**, die an mich geglaubt haben. Den **En Move-Mädels** danke ich darüber hinaus für den sportlichen Ausgleich.

Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht. Es folgt die Publikationsliste von Gabriela Wochnik:

Herr, A., **Wochnik, G.M.**, Rosenhagen, M.C., Holsboer, F., und Rein, T. (2000). Rifampicin is not an activator of the glucocorticoid receptor. *Mol.Pharmacol.* 57, 732-737.

Rosenhagen, M.C., Young, J.C., **Wochnik, G.M.**, Herr, A., Schmidt, U., Hartl, F.U., Holsboer, F., und Rein, T. (2001). Synergistic inhibition of the glucocorticoid receptor by radicicol and benzoquinone ansamycins. *Biol.Chem.* 382, 499-504.

Abel, A., **Wochnik, G.M.**, Rüegg, J., Rouyer, A., Holsboer, F., und Rein, T. (2002). Activity of the glucocorticoid receptor in G2 and mitosis. *Molecular Endocrinology* 16, 1352-1366.

Schmidt, U., **Wochnik, G.M.**, Rosenhagen, M.C., Hartl, F.U., Holsboer, F., und Rein, T. (2003). Essential role of the unusual DNA binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* 278, 4926-4931

Wochnik, G.M., Young, J.C., Schmidt, U., Holsboer, F., Hartl, F.U., und Rein, T. (2004). Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Lett.* 560, 35-38

Wochnik, G.M., Abel, A., Schmidt, U., Holsboer, F., und Rein, T. (2004). FKBP51 and FKBP52 Differentially Regulate Corticosteroid Receptors: Contribution of Dynein Interaction and Nuclear Translocation in Mammals. Zur Veröffentlichung bei *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* eingereicht.

Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., **Wochnik, G.M.**, Ising, M., Pütz, B., Papiol, S., Nickel, T., Künzel, H.E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Brückel, T., Müller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J.C., Löhmussaar, E., Strom, T.M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., und Mueller-Myhsok, B. (2004). Polymorphisms in FKBP5, a glucocorticoid receptor regulating co-chaperone of hsp90, predict treatment response in depression. Zur Veröffentlichung bei *Science* eingereicht.

1. Einleitung	1
1.1 Die HPA-Achse	1
1.2 Veränderungen der HPA-Achse bei der depressiven Störung	2
1.3 Corticosteroidrezeptoren als Transkriptionsfaktoren	3
1.4 Molekulare Chaperone	5
1.5 Der Hsp90-Heterochaperonkomplex	6
1.5.1 TPR- Proteine	11
1.5.2 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen	11
1.5.2.1 FKBP52	12
1.5.2.2 FKBP51	13
1.5.3 p23	14
1.6 Problemstellung	16
2. Material	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Enzyme	18
2.3 Marker	18
2.4 Antikörper	19
2.4.1 Primäre Antikörper	19
2.4.2 Sekundäre Antikörper, Peroxidase gekoppelt	19
2.5 Bakterien	20
2.6 Zellkultur	20
2.6.1 Zelllinien	20
2.6.2 Medien für die Zellkultur	20
2.7 Plasmide	21
2.7.1 Rezeptor-, Reporter-, allgemeine Plasmide	21
2.7.2 FKBP-Plasmide	24
2.7.3 p23-Plasmide	28
2.8 Oligos und Primers	31
2.8.1 FKBP-Oligos	31
2.8.1.1 FKBP51 und Chimäre	31
2.8.1.2 FKBP52	33
2.8.2 p23-Oligos	35
2.8.3 sonstige Oligos	37
2.9 Geräte	38
2.10 Kits	39
3. Methoden	40
3.1 Bakterienkultur	40

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	40
3.1.2 Kultur von Escherichia coli	41
3.1.3 Transformation	41
3.2 DNA-Präparation und Reinigung	41
3.2.1 Minipräparation mit E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit	41
3.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	42
3.2.3 Phenolextraktion	43
3.2.4 Ethanolfällung	43
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	43
3.3 Präparation von DNA-Fragmenten	44
3.3.1 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	44
3.3.2 Gelelektrophorese	44
3.3.3 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden	45
3.3.4 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden	45
3.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	46
3.3.6 Abbau von 3'-überhängenden Enden	46
3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	47
3.3.8 Ligation von DNA	47
3.4 Klonierungen.....	47
3.5 Blau-Weiß-Selektion	48
3.6 Zellkultur	50
3.6.1 Herstellung verschiedener Lösungen für die Zellkultur	50
3.6.1.1 Aktivkohle-DextranT70 Mischung.....	50
3.6.1.2 Steroid-freies FBS.....	50
3.6.1.3 Trypsin	50
3.6.2 Vermehrung, Lagerung und Inkulturnahme	50
3.6.3 Mycoplasmentest	51
3.7 Transfektionen	52
3.7.1 Kationisches, polymerisches Transfektionsreagenz	52
3.7.2 CaPO ₄ -Methode.....	53
3.7.3 Elektroporation.....	53
3.8 Messung der CR Aktivität mittels Luciferase-Reportergen-Assay.....	54
3.8.1 Luciferase-Assay	55
3.8.2 Galaktosidase-Messung.....	56
3.8.3 Auswertung der Daten	56
3.8.4 Fluoreszenz-Lokalisierung von Proteinen.....	57
3.9 RNA interference	57

3.10 Proteinbiochemische Methoden	58
3.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
3.10.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	59
3.10.3 Coomassie-Färbung.....	60
3.10.4 Immunoblotting	61
3.10.5 Protein-Protein-Co-Immunpräzipitation	62
3.11 Proteinexpression und Aufreinigung.....	63
4. Ergebnisse	65
4.1 Etablierung eines zellulären Systems zur Messung der Aktivität von Hormonrezeptoren.....	65
4.2 FKBP51 hemmt spezifisch Corticoidrezeptoren	65
4.3 Der Effekt von FKBP51 ist abhängig von der Interaktion mit Hsp90.....	70
4.4 FKBP52 antagonisiert den Effekt von FKBP51	72
4.5 Reduktion der endogenen Mengen von FKBP52 hat keinen Effekt auf die Aktivität des GRs.....	74
4.6 FKBP51 reduziert die nukleäre Translokation der CR.....	75
4.7 Ist die PPIase-Aktivität für die jeweilige Funktion von FKBP52 oder FKBP51 in der CR-Signaltransduktion notwendig?.....	80
4.8 Unterschiede in der PPIase-Domäne von FKBP51 und FKBP52 führen zur unterschiedlichen Interaktion mit Dynein.....	83
4.9 Ein N-terminales Fragment von FKBP52, aber nicht von FKBP51 beeinflusst die nukleäre Translokation des GRs.....	86
4.10 Korrelation zwischen Polymorphismen im Gen von FKBP51 und Ansprechen auf Antidepressiva	87
4.11 p23 hemmt die GR-Aktivität	88
4.12 Identifikation von Aminosäuren in p23, die für die Hsp90-Bindung notwendig sind ..	90
4.13 p23 reduziert Hsp90-abhängig die Aktivität eines konstitutiv nukleären GRs	92
5. Diskussion	94
5.1 Die Rolle von FKBP51 und FKBP52 im Hsp90-Heterokomplex.....	94
5.2 Spielt FKBP51 bei der Depression eine Rolle?	99
5.3 Die Cochaperon-Funktion von p23 in der GR-Transaktivierung	101
5.4 Ausblick	103
6. Zusammenfassung	105
7. Literaturverzeichnis	107
8. Abkürzungen.....	125
Lebenslauf.....	127

1. Einleitung

1.1 Die HPA-Achse

Obwohl Stress ein weithin geläufiger Begriff ist, ist seine Bedeutung im allgemeinen nicht scharf umrissen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts definierte H. Selye Stress als Reaktionsprozeß eines Organismus auf ganz verschiedenartige Schädigungen, die sogenannten Stressoren. Während am Anfang der Stressforschung physische Stressoren im Vordergrund standen, ist inzwischen anerkannt, daß eine Reihe psychologischer Stressoren zu den wirkungsvollsten Auslösern von Stress gehören (Heuser und Lammers, 2003).

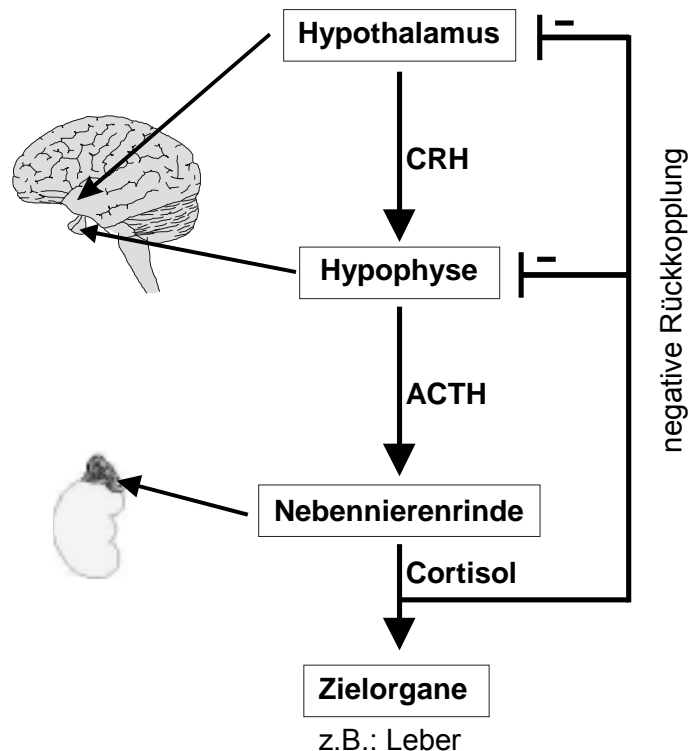


Abb. 1: Schematische Darstellung der HPA-Achse

An der fein abgestimmten Hormonkaskade der Stressantwort sind der Hypothalamus, die Hypophyse sowie die Nebennierenrinde beteiligt. Bei Stress schüttet der Hypothalamus das Hormon CRH (Corticotropin Releasing Hormon) aus, daraufhin produziert die Hypophyse ACTH (adrenocorticotropes Hormon), was wiederum die Nebennierenrinde zur Freisetzung von Cortisol anregt. Cortisol kontrolliert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse).

Zur Stressbewältigung hat sich bei Säugetieren eine fein abgestimmte Hormonkaskade entwickelt, die den Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde umfaßt. Dieses neuroendokrine System, auch hypothalamo-hypophysäre-adrenocorticale (engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal = HPA) Achse genannt, unterliegt einem komplexen Regulationsgefüge (Abb. 1) (Levine, 2000). Der Reiz des einwirkenden Stressors wird durch afferente Leitungsbahnen des peripheren Nervensystems an das zentrale Nervensystem (ZNS) geleitet, u.a. in die Strukturen des limbischen Systems sowie in den cerebralen Cortex. Nachdem ein Reiz im ZNS als "Stress" bewertet wurde, sezernieren die Neuronen des hypothalamischen Nucleus paraventricularis Corticotropin Releasing Hormon (CRH) (Owens und Nemeroff, 1993; Kovacs und Sawchenko, 1996). Angeregt durch CRH geben corticotrope Zellen der Hypophyse adrenocorticotropines Hormon (ACTH) in den peripheren Blutkreislauf ab. Das ACTH induziert in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Glucocorticoiden, wie Cortisol (Mensch) bzw. Corticosteron (Ratte, Maus). Die aufeinanderfolgende Freisetzung von CRH, ACTH und den Corticoiden bewirkt u.a. die Energiebereitstellung für die physiologische Anpassungsreaktion, z.B. durch Induktion der Lipolyse und Glyconeogenese in der Leber sowie des Proteinkatabolismus (Riad et al., 2002). Die Aktivität der HPA-Achse wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus (engl.: negative feedback loop) kontrolliert. Hierbei reduzieren die zirkulierenden Glucocorticoide durch Aktivierung der Corticosteroidrezeptoren die Ausschüttung von CRH und ACTH (Sapolsky und McEwen, 1985) und regulieren dadurch ihre eigene Synthese.

1.2 Veränderungen der HPA-Achse bei der depressiven Störung

Depressive Störungen gehören zusammen mit den Angsterkrankungen zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen weltweit. Einer Studie der Weltgesundheitsorganisation zufolge wird im Jahr 2020 die Depression die zweithäufigste Krankheit sein (Murray und Lopez, 1996). Leider sind die neurobiologischen und genetischen Mechanismen, die zu depressiven Störungen führen, noch unzureichend geklärt.

Ende der 60er Jahre wurde berichtet, daß ein Grossteil der depressiven Patienten erhöhte basale Cortisolspiegel im Serum aufweist, die sich nach erfolgreicher Medikation wieder normalisieren (Butler und Besser, 1968). Diese bei psychiatrischen Erkrankungen beobachteten Veränderungen der HPA-Aktivität werden mit dem Dexamethason-CRH-Test gemessen (Heuser et al., 1994). Bei diesem Test werden geringe Mengen des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason (Dex) verabreicht, welches normalerweise am nächsten Tag eine Suppression von Cortisol bewirkt (vgl. Abb. 1). Die nachfolgende Gabe von CRH gibt Aufschluß über mögliche zentrale Regulationsstörungen. Bei einer depressiven Störung ist die durch CRH-Gabe induzierte Ausschüttung von ACTH und

folglich auch die von Cortisol meist deutlich höher als bei gesunden Probanden. Mit Hilfe des Dex-CRH-Tests wurden bei den meisten depressiven Patienten folgende Veränderungen der HPA-Achse festgestellt (Holsboer und Barden, 1996; De Kloet et al., 1998):

1. Erhöhte basale Cortisolplasmaspiegel, die mit Dex nicht supprimiert werden können.
2. Erhöhte ACTH- und CRH-Blutspiegel nach direkter Stimulation der corticotropen Zellen der Hypophyse mit CRH.

Dies zeigt, daß der über Cortisol regulierte negative Rückkopplungsmechanismus gestört ist, was wiederum ein Hinweis auf eine Fehlfunktion der Corticosteroidrezeptoren ist (Holsboer, 2000). Man spricht daher auch von einer Glucocorticoid-Resistenz. Nach einer Behandlung mit Antidepressiva kommt es bei vielen Patienten nicht nur zu einer Besserung der psychiatrischen Symptome, sondern auch zu einer Normalisierung der Funktion der HPA-Achse (Holsboer et al., 1982). Diejenigen Patienten, die bei der Entlassung zwar eine Verbesserung der psychopathologischen Symptome, jedoch nicht der HPA-Aktivität aufweisen, zeigen ein statistisch deutlich erhöhtes Risiko für einen Rückfall (Zobel et al., 1999).

1.3 Corticosteroidrezeptoren als Transkriptionsfaktoren

Die Effekt der Corticoide werden durch zwei homologe Steroidrezeptoren vermittelt: den Mineralocorticoidrezeptor (MR oder Typ1-Rezeptor) und den Glucocorticoidrezeptor (GR oder Typ2-Rezeptor) (De Kloet et al., 1986). Beide Rezeptoren gehören zu der Familie der ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf et al., 1995).

Der MR wird vor allem in limbischen Strukturen, wie dem Hippocampus, dem cerebralen Septum, und den Amygdala exprimiert und trägt wesentlich zur Regulation der basalen Aktivität der HPA-Achse bei (De Kloet et al., 1993; Deuschle et al., 1998). Der GR hingegen wird in weiten Bereichen des Gehirns exprimiert, vor allem im limbischen System, in parvozellulären Neuronen des paraventriculären Kerns und im Hirnstamm. Aber auch in anderen Organen, wie der Lunge, der Leber, dem Knochenmark und dem Immunsystem, ist der GR an wichtigen, physiologischen Prozessen beteiligt (Evans-Storms und Cidlowski, 1995; Schmid et al., 1995). Beide Rezeptoren besitzen die für Steroidrezeptoren charakteristische Domänenstruktur (Abb. 2) (Evans, 1988).

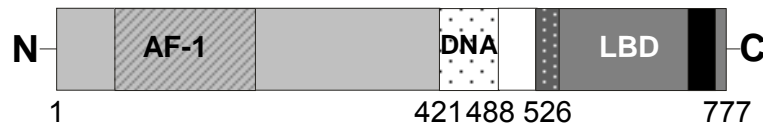


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Steroidrezeptoren am Beispiel des GRs.

Folgende Domänen sind gekennzeichnet: Variabler Teil im N-Terminus (hellgrauer Bereich) mit der AF-1 Domäne (schraffiert), DNA-Bindungs-Domäne (weiß gepunktet), NL1-Domäne (weiß), die Ligandenbindungsdomäne (LBD) (dunkelgrauer Bereich) mit der tau2 Domäne (grau gepunktet) und AF-2 Domäne (schwarz).

Während die mittelständige Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, zwischen beiden Rezeptoren sehr homolog ist, zeichnet sich die N-terminale Region durch eine große Varianz aus. Für den GR wurde gezeigt, daß der N-terminale Bereich die Domäne AF-1/tau1 (Aktivierungsfunktion-1) enthält, die für die Transaktivierung und die Wechselwirkung mit bestimmten Proteinen des Transkriptionskomplexes von Bedeutung ist (Almlöf et al., 1998; Giguere et al., 1986; Hollenberg et al., 1987). Im C-Terminus der beiden Rezeptoren befindet sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die auch die Dimerisierungsregion beinhaltet. Die LBD enthält zudem eine Interaktionsdomäne für Hsp90 (heat shock protein 90) sowie außer der beschriebenen AF-1-Domäne noch zwei weitere Aktivierungsdomänen. Angrenzend an den N-terminalen Bereich der LBD findet man die Aktivierungsdomäne tau2 (Milhon et al., 1997) und im C-Terminus der LBD die Aktivierungsdomäne AF-2, welche für die Bindung von nukleären Coaktivatoren nötig ist (Ma et al., 1999; Kucera et al., 2002). Beim GR werden auch zwei nukleäre Lokalisationssequenzen NL1 und NL2 gefunden, die für den Transport in den Zellkern von Bedeutung sind. Die an die DNA-Bindungsdomäne grenzende NL1 wird beim ligandenfreien GR durch die NL2 maskiert, die in der LBD lokalisiert ist. Durch Hormonbindung kommt es zu einer Veränderung der Konformation, so daß die NL1 zugänglich wird und der Kerntransport erfolgen kann (Cadepond et al., 1992).

Corticosteroide binden intrazellulär an die beiden Rezeptoren, wobei sich der GR und der MR in ihrer Affinität zum Hormon unterscheiden. Im Vergleich zum GR weist der MR eine ca. 10mal höhere Affinität zu Corticoiden auf. Man geht daher davon aus, daß bei niedrigen Corticoidkonzentrationen im Serum, wie z.B. in den Morgenstunden oder in stressarmen Situationen, nur der MR aktiviert ist (De Kloet et al., 1993). Steigt durch Stress die Cortisolkonzentration im Blut an, so wird schließlich auch der GR aktiv (Joels und De Kloet, 1994; De Kloet et al., 1993). Die Hormonbindung an die Rezeptoren bewirkt deren Translokation in den Zellkern, wo diese in das Transkriptionsgeschehen eingreifen. Sie wirken entweder stimulierend oder hemmend auf die Expression bestimmter Zielgene. Durch

Bindung als Rezeptor-Dimere an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten Glucocorticoid responsiven Elemente (GREs), kann die Transkription bestimmter Gene induziert werden (Transaktivierung). Transrepression, d. h. die Reduktion der Expression bestimmter Gene, erfolgt entweder durch DNA-Bindung an negative GREs oder durch Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (activator protein 1) oder NF- κ B (nuclear factor-kappaB) (Beato et al., 1995).

Für die u.a. bei depressiven Patienten beobachtete Glucocorticoid-Resistenz kann man mindestens drei unterschiedliche Mechanismen postulieren:

(a) Eine naheliegende Erklärungsmöglichkeit wären Mutationen im GR selbst, die seine Funktion beeinträchtigen. Allerdings konnten bis jetzt in den meisten Fällen keine Mutationen im GR gefunden werden, die mit dem Vorliegen einer affektiven Erkrankung korrelieren (Koper et al., 1997; Moutsatsou et al., 2000).

(b) Denkbar wäre auch, daß die Rezeptoranzahl in bestimmten Hirnarealen reduziert ist. Bei depressiven Patienten wurden in der Tat Veränderungen im Verteilungsmuster beider Corticoidrezeptoren gefunden, insbesondere im Hypothalamus (De Kloet, 2000). Es wurde auch gezeigt, daß die mRNA des GRs in verschiedenen Regionen reduziert ist (Webster et al., 2002). Möglicherweise führt der persistierende Hypercortisolismus während einer depressiven Episode sekundär zu einer Herabregulation des GRs und MRs.

(c) Schließlich könnten auch Faktoren betroffen sein, die an der Regulation beider Rezeptoren beteiligt sind.

Bei diesen Regulatoren unterscheidet man in erster Näherung zwei Gruppen: Die nukleären Coregulatoren (Leo und Chen, 2000) und die zytosolischen Chaperone. Die nukleären Cofaktoren werden in vielen Laboratorien weltweit intensiv bearbeitet. Im Vergleich dazu ist die Funktion der molekularen Chaperone in der Signaltransduktionskette von Steroidrezeptoren weniger erforscht.

1.4 Molekulare Chaperone

Nach dem klassischen Paradigma ist die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch die Abfolge seiner Aminosäuren bestimmt (Anfinsen, 1973) und seine Faltung erfolgt spontan und ohne Energieverbrauch (Jaenicke, 1993). Nach der Entdeckung der molekularen Chaperone als Hilfsproteine für Faltungsprozesse wurde dieses Paradigma modifiziert: Chaperone stellen zwar keine sterische Information zur Verfügung, aber sie verhindern die Ausbildung von Fehlkonformationen, u.a. indem sie inkorrekt gefaltete Proteine unter Energieaufwand entfalten. Das Protein erhält so die Möglichkeit, erneut seine funktionelle Konformation zu finden.

Die Exposition von hydrophoben Oberflächen führt in vitro wie auch in vivo zur Akkumulation von nicht funktionellen Proteinen und zu deren Aggregation. Dies ist insbesondere bei der in vivo vorliegenden hohen Gesamtproteinkonzentration zu erwarten. In der Zelle garantieren molekulare Chaperone und Faltungskatalysatoren wie Protein-Disulfid-Isomerasen und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen eine möglichst hohe Ausbeute an funktionellen Proteinen (Ellis, 1990; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Unter zellulären Stressbedingungen wie z.B. bei Hitze oder durch Einwirken bestimmter Chemikalien steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von falsch gefalteten Proteinen und damit der Bedarf an Chaperonen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Entsprechend erhöht sich die Expression der Chaperone unter solchen Bedingungen; sie gehören dadurch zu den klassischen Hitzeschockproteinen (Hsp) (Georgopoulos und Welch, 1993; Gething und Sambrook, 1992). Viele werden aber auch konstitutiv exprimiert und sind für spezielle zelluläre Prozesse von Bedeutung (Hartl, 1996; Agashe und Hartl, 2000). Chaperone werden aufgrund von Sequenzhomologien und ihrer apparenten Molmasse in verschiedene Klassen eingeteilt. Die Hauptgruppen in Säugetieren sind:

- die Hsp90-Familie (Pratt und Toft, 1997; Buchner, 1999),
- die Hsp70-Familie und
- die Hsp60-Familie (Fink, 1999).

In der Zelle agieren die Chaperone weniger als Einzelproteine, sondern schließen sich vielmehr mit weiteren Faktoren zu komplexen Systemen zusammen (Hartl, 1998; Buchner, 1996), die auch als "Faltungsplattformen" bezeichnet werden.

1.5 Der Hsp90-Heterochaperonkomplex

Das Chaperon Hsp90 ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in der Zelle und macht unter stressfreien Bedingungen bereits 1-2% der gesamten Proteinmasse im Zytosol aus (Welch und Feramisco, 1982). Durch Einwirkung verschiedener zellulärer Stressfaktoren kann die Menge an Hsp90 noch weiter ansteigen. Hsp90 ist ein zytosolisches Protein, kann aber unter Einfluß verschiedener Faktoren auch in den Kern gelangen (Gasc et al., 1990). Beim Menschen werden zwei verschiedene Isoformen gefunden, wobei Hsp90 α vorwiegend nach zellulärem Stress, Hsp90 β dagegen konstitutiv exprimiert wird (Nemoto et al., 1997). Die Bedeutung von Hsp90 wird durch die Tatsache unterstrichen, daß Hsp90 evolutionär hochkonserviert ist und in verschiedenen Spezies wie Bakterien, Hefe, Fruchtfliege und Mensch vorkommt (Pratt und Toft, 1997). Eine Rolle von Hsp90 in der Evolution wird durch folgenden Befund nahegelegt (Rutherford und Lindquist, 1998): An Fruchtfliegen wurde gezeigt, daß die Hemmung von Hsp90 in kurzer Zeit zur Ausprägung von vielen, variantenreichen Phänotypen führt, die in der Weiterzucht unabhängig von der Hemmung von Hsp90 werden. Obwohl der genaue Mechanismus dieses interessanten Phänomens

noch ungeklärt ist, geht man davon aus, daß Hsp90 kryptische genetische Variationen puffern kann, indem es mutierten Proteinen hilft, ihre ursprüngliche Struktur bzw. Funktion zu erhalten. Erst bei einer Fehlfunktion von Hsp90 können sich die bis dahin unterdrückten Phänotypen manifestieren. In der Entwicklungsgeschichte könnte dies von Bedeutung sein, da manche dieser Phänotypen einen evolutionären Vorteil haben könnten. Es ist davon auszugehen, daß Hsp90 unter Stressbedingungen seine vielfältigen Aufgaben nicht mehr vollständig erfüllen kann, und gerade unter anhaltenden Stressbedingungen kann eine Adaption an veränderte Umweltbedingungen notwendig sein.



Abb. 3: Domänenstruktur von Hsp90

Dargestellt ist die ATPase-Domäne (hellgrau), der geladene Linker (schraffiert), sowie der C-terminale Teil (dunkelgrau), der die Dimerisierungsdomäne und die TPR-Bindungsdomäne enthält.

Für die Chaperonaktivität von Hsp90 sind zwei seiner Domänen wichtig: die ATP-bindende Region im N-Terminus und die Substratbindungsdomäne, die sich im C-Terminus befindet. Beide Domänen sind hoch konserviert und durch einen geladenen Linker miteinander verbunden (Abb. 3). Sowohl das isolierte N- als auch das isolierte C-terminale Fragment von Hsp90 zeigen Chaperonaktivität (Young et al., 1997; Scheibel et al., 1998). In vivo tritt Hsp90 als Dimer auf, wobei sich die Dimerisierungsstelle in der Substratbindungsregion befindet. Die Bedeutung von Hsp90 liegt u.a. in der Vielzahl von Substraten, die durch dieses Chaperon in ihre aktive Konformation gebracht werden. Dazu zählen neben den Steroidrezeptoren (Pratt und Toft, 1997) der Aryl Hydrocarbon Rezeptor (Bell und Poland, 2000; Heid et al., 2000), der Hitze-Schock-Faktor-1 (HSF-1) (Bharadwaj et al., 1999; Guo et al., 2001), Tyrosinkinase wie p60v-src (Xu et al., 1999; Whitesell et al., 1994), Serin/Threonin Kinasen wie Raf-1 (Grammatikakis et al., 1999; Schulte et al., 1995), die Telomerase (Holt et al., 1999) und eine mutierte Form von p53 (Nagata et al., 1999; Sepelny et al., 1996). Hsp90 wirkt dabei in einem Heterokomplex zusammen mit verschiedenen Cochaperonen und Cofaktoren (vgl. Tabelle 1.5). Diese Komplexe sind in der Lage einen partiell gefalteten Zustand des Substratproteins zu stabilisieren.

Allgemeiner Name	Name in Wirbeltieren	Name in Hefe	Funktion	TPR-Motif
DnaK	Hsp70	Ssa 1p	Chaperon	-
DnaJ	Hsp40,Hdj1	Ydj1	Hsp70-Cochaperon	-
ST13	Hip, p48	-	Hsp70-Cochaperon	-
Sti1	Hop, p60	Sti1	Assemblierungsfaktor für Hsp90 und Hsp70	+
STUB1	Chip	-	Hsp70-Cochaperon	+
Bag1	Bag1	-	Hsp70-Cochaperon	-
Cdc37	p50/Cdc37	Cdc37p	Kinase-spezifischer Cofaktor	?
FKBP5	FKBP51, p54, FKBP54	-	Prolylisomerase, Chaperon	+
FKBP4	FKBP52, p59, p56, HBI, Hsp56	-	Prolylisomerase, Chaperon	+
PpiD	Cyp40	Cpr6p, Cpr7p	Prolylisomerase, Chaperon	+
PP5	PP5	PPT1	Serin-Phosphatase	+
AIP	XAP2, ARA9, FKBP37	-	Prolylisomerase	+
TEBP	p23	Sba1	Chaperon, Hsp90-Cochaperon	-

Tabelle 1.5: Übersicht über Proteine des Hsp90-Chaperonheterokomplexes (verändert nach Buchner,1999)

Von allen bekannten Hsp90-Substratproteinen ist die Faltung der Steroidrezeptoren am besten untersucht. Sie erfolgt in einer stufenweisen, energieverbrauchenden Reaktion unter Mitwirkung einer Reihe von Chaperonen und Cofaktoren (vgl. Tabelle 1.5). Im ersten Schritt bindet der freie Rezeptor mit einer geschlossenen Hormonbindungstasche an Hsp70. Diese Interaktion ist an die Hydrolyse von ATP durch Hsp70 gekoppelt, die durch das Cochaperon Hsp40 stimuliert wird (Morishima et al., 2000) (Abb. 4 Punkt 1). Nachfolgend bindet Hop (Hsp organisierendes Protein), welches zwei unterschiedliche Tetratricopeptid-repeat (TPR)-Domänen besitzt (vergl. Abschnitt 1.5.1) (Scheufler et al., 2000), an Hsp70 (Abb. 4 Punkt 2) (Dittmar und Pratt, 1997). Die zweite TPR-Domäne von Hop ermöglicht die

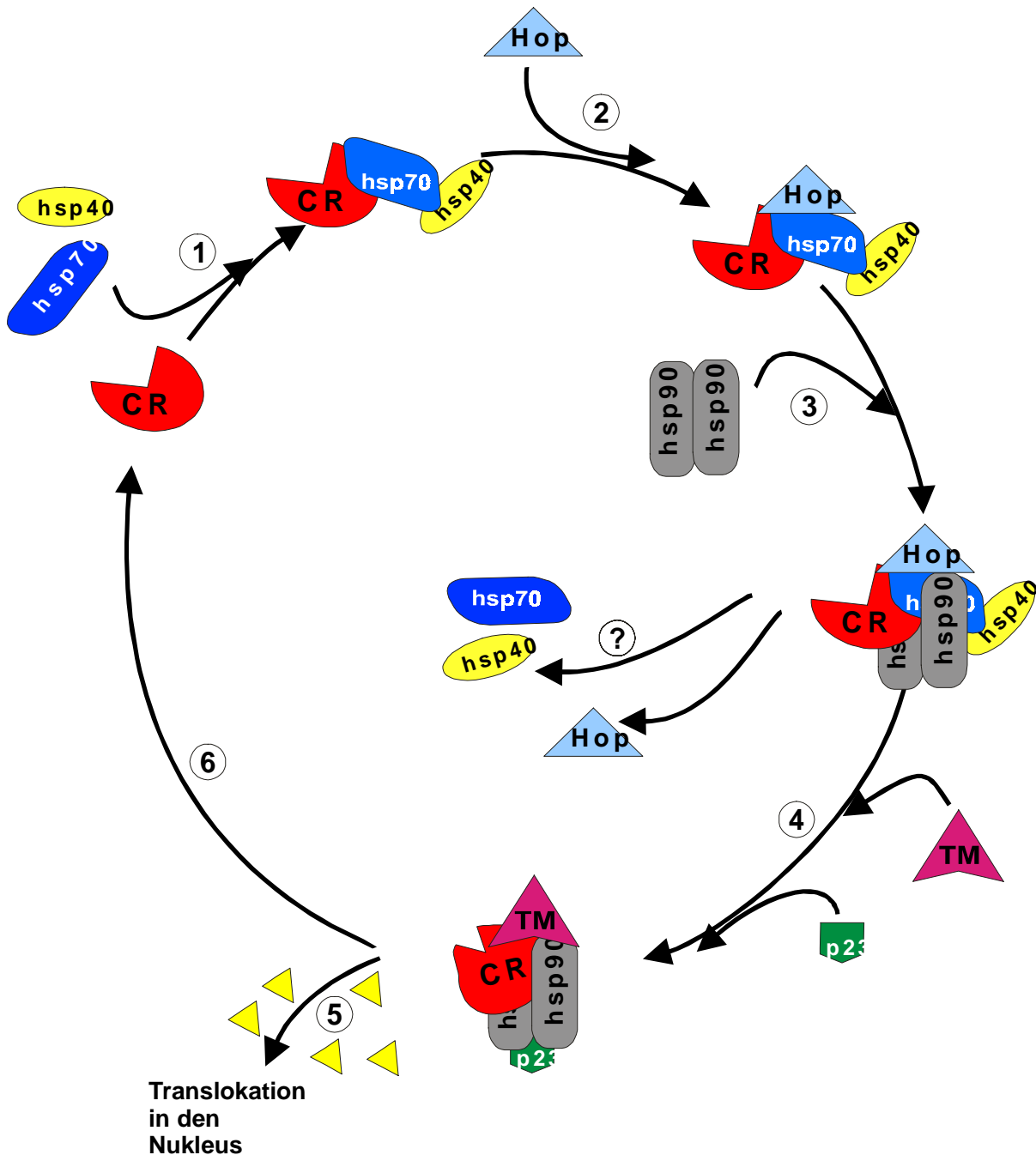


Abb. 4: Darstellung der Faltung der Steroidrezeptoren durch den Hsp90-Heterokomplex

(1) Bindung von Hsp70 und Hsp40 an den ungefalteten Corticoidrezeptor (CR). (2) Eintritt von Hop in den Komplex. (3) Hsp90 bindet an Hop und wird in den Komplex eingebaut. (4) Austausch von Hop durch einen Targetmodulator (TM) und Wechselwirkung von p23 mit Hsp90. Es ist noch nicht bekannt, ob Hsp70 und Hsp40 mit Hop den Komplex verlassen (Pfeil ist mit Fragezeichen gekennzeichnet). Im diesem Komplex ist der Rezeptor in der Lage, seinen Liganden mit hoher Affinität zu binden und daraufhin in den Zellkern zu wandern (5), oder falls kein Ligand vorhanden ist, erneut in den Faltungskreislauf zu gelangen (6).

Integration eines Hsp90-Dimeren in den Komplex (Abb. 4 Punkt 3). Im weiteren Prozeß verläßt Hop und wahrscheinlich auch Hsp70 den Komplex und werden durch einen sogenannten Targetmodulator ersetzt. Der Targetmodulator bindet ebenso wie Hop über eine TPR-Domäne an Hsp90, so daß sie miteinander um die Bindungsstelle an Hsp90 konkurrieren. Der so entstehende Komplex enthält nun entweder FKBP51 (vgl. Abschnitt 1.5.2.2), FKBP52 (vgl. Abschnitt 1.5.2.1), Cyp40 oder PP5 (Protein Phosphatase5), abhängig davon, welches Zielprotein der Komplex enthält (Abb. 4 Punkt 4). In diesem Komplex ist der Rezeptor in der Lage, den Liganden mit hoher Affinität zu binden. Nach der Liganden-Bindung erfolgt die Translokation des Rezeptors in den Zellkern um dort Transkriptionsereignisse zu regulieren (Abb. 4 Punkt 5) (vgl. Abschnitt 1.3). Findet keine Hormonbindung statt, so zerfällt der reife Komplex innerhalb kurzer Zeit und der Chaperonzyklus beginnt von neuem (Abb. 4 Punkt 6).

Im hoch-affinen Hsp90-Komplex findet man auch noch das kleine acide Protein p23, welches den Komplex stabilisiert (Smith, 1998) (vgl. Abschnitt 1.5.3). p23 interagiert mit der ATP-gebundenen Form von Hsp90, während Hop nur an die ADP-gebundene Form bindet. Die ATP-Hydrolyse von Hsp90 ist für die Öffnung der Hormonbindungstasche der Rezeptoren nötig, da ATPase-Mutanten von Hsp90 zwar einen vollständigen Komplex ausbilden, aber den Steroidrezeptor nicht in eine Hormon-bindungsfähige Konformation bringen können (Grenert et al., 1999). Die ATP-Umsatzgeschwindigkeit von Hsp90 ist nur gering (Obermann et al., 1998; Scheibel et al., 1998; Panaretou et al., 1998). Diese ATPase-Aktivität wird durch die verschiedenen TPR-Proteine (vgl. Tabelle 1.5), p23 und die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des GRs reguliert. So inhibiert z.B. Sti1, das Homologe von Hop in Hefe, komplett die ATPase-Aktivität von Hsp82, dem Hefehomologen von Hsp90 (Prodromou et al., 1999). Humanes Hop hingegen beeinflusst die basale ATPase-Aktivität von Hsp90 nur geringfügig, reduziert aber die durch LBD-Bindung stimulierte ATP-Hydrolyse (McLaughlin et al., 2002). Der Reaktionszyklus der ATP-Bindung und -Hydrolyse von Hsp90 konnte mittels fluoreszierender ATP-Analoga näher untersucht werden (Weikl et al., 2000). Durch eine Konformationsänderung von Hsp90 kann das gebundene Nukleotid erst nach seiner Hydrolyse wieder freigesetzt werden. Die isolierte N-terminale ATP-bindende Domäne weist alleine nur eine geringe Hydrolyse-Rate auf (Weikl et al., 2000). Für eine maximale Umsatzgeschwindigkeit ist neben dem N-Terminus auch der C-Terminus wichtig. Dies zeigt, daß die durch Bindung und Hydrolyse von ATP verursachten Konformationsänderungen das gesamte Hsp90-Protein betreffen. Die Zytostatika Geldanamycin und Radicol inhibieren die Chaperonaktivität von Hsp90, indem sie an die ATP-Bindungsstelle binden und dadurch die ATPase-Aktivität hemmen (Roe et al., 1999).

1.5.1 TPR- Proteine

Der C-terminale Teil von Hsp90 enthält die Bindungsstelle für eine Reihe von Proteinen, denen ein bestimmtes Bindungsmotiv gemeinsam ist, die sogenannte Tetratrico-peptid-repeat (TPR)-Domäne (vgl. Tabelle 1.5) (Chen et al., 1998). Ein TPR-Motiv besteht aus degenerierten, 34 Aminosäuren umfassenden, repetitiven Elementen, deren Aminosäuren an charakteristischen Positionen konserviert sind. Sie bilden zwei antiparallele Helices, die durch einen kurzen "Turn" verbunden sind (Das et al., 1998). Die TPR-Domänen sind v. a. für Protein-Protein Wechselwirkungen von Bedeutung (Scheufler et al., 2000).

1.5.2 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen

Die cis/trans-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen gehört oft zu den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten der Proteinfaltung (Kim und Baldwin, 1982; Creighton, 1984). Es wird angenommen, daß am Ribosom nur die trans-Konformation synthetisiert wird (Lim und Spirin, 1986) und die cis-Peptidyl-Prolyl-Bindungen später eingeführt werden. Enzyme, die diesen Schritt katalysieren, werden Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen) oder Rotamasen genannt. Im Gegensatz zu Chaperonen handelt es sich bei PPIasen um echte Katalysatoren, da sie die Isomerisierung ohne Energieaufwand und ohne das Reaktionsgleichgewicht zu beeinflussen beschleunigen (Lilie et al., 1993).

Bisher sind drei verschiedene Untergruppen von Rotamasen bekannt: die FKBP (FK506-Binding-Proteins), die Cyclophiline (Cyphs) und die Parvuline. Im folgenden werden die ersten beiden näher besprochen, die sich insofern ähneln, als sie bestimmte Immunsuppressiva binden. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie auch eingeteilt: Binden sie FK506 oder Rapamycin, werden sie den FK506-bindenden Proteinen (FKBPs) zugeordnet. Binden sie hingegen Cyclosporin A, zählt man sie zu den Cyclophilinen. Die Bindung der Immunsuppressiva führt zur Hemmung der PPIase-Aktivität und der entstehende Komplex aus FKBP bzw. Cyclophilin und Immunsuppressivum ist schließlich für die immunsuppressive Wirkung verantwortlich. FKBP-FK506 und Cyclophilin-CyclosporinA Komplexe wechselwirken mit Calcineurin, einer für Serin/Threonin spezifischen und durch Ca^{2+} -Calmodulin-aktivierten Protein Phosphatase (Liu et al., 1992). Calcineurin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Transkriptionsfaktors NF-AT (engl: nuclear factor of activated T-cells), der für die Aktivierung von T-Zellen wichtig ist (Clipstone und Crabtree, 1992). Die Bindung des Komplexes aus Immophilin und Immunsuppressivum an Calcineurin führt dazu, daß NF-AT nicht mehr dephosphoryliert werden kann, und somit nicht mehr in den Zellkern gelangt. NF-AT kann daher die Transkription von IL-2, das für die T-Zellen Signaltransduktionkaskade nötig ist, nicht mehr aktivieren. Die immunsuppressive Wirkung

von FKBP-Rapamycin-Komplexen beruht auf einer Wechselwirkung mit der Protein-Lipid-Kinase FRAP/RAFT (Hamilton und Steiner, 1998).

In Säugetierzellen sind eine Vielzahl verschiedener FKBP's und Cyclophiline bekannt, die aufgrund Ihrer Größe unterschieden werden. Die Bedeutung der PPlasen für höhere Eukaryonten zeigt sich am Beispiel einer Maus mit FKBP12-Deletion, die schwere, teils sogar lethale Herzmuskeldefekte aufweist (Shou et al., 1998). Dies wird auf Veränderungen des mit FKBP12 assoziierten Ca^{2+} -Kanals Ryanodin-Receptor2 zurückgeführt. Auch in Pflanzen führen Mutationen in PPlase-Genen zu Entwicklungsstörungen. In *Arabidopsis thaliana* zeigen entsprechende PPlase-Mutanten Entwicklungsdefizite mit unkontrolliertem Zellwachstum (Vittorioso et al., 1998). Überexpression von FKBP77 in Weizen führt zu morphologischen Anormalitäten und Sterilität (Kurek et al., 2002). In Hefe allerdings lassen sich alle Cyclophiline und FKBP's ausschalten, ohne daß das Überleben beeinträchtigt ist (Dolinski et al., 1997). Daraus kann man schließen, daß Immunophiline in höheren Eukaryonten sehr spezifische Funktionen übernommen haben. In Säugetieren werden drei große Immunophiline im Komplex mit Hsp90 und den Steroidrezeptoren gefunden: FKBP51, FKBP52 und Cyp40. Im Gegensatz zu den kleinen Immunophilinen, wie FKBP12, besitzen sie neben der PPlase-Domäne auch eine TPR-Domäne für die Hsp90-Interaktion (Abb. 5). Die Notwendigkeit von TPR-Proteinen für die effiziente Signaltransduktion der Steroidrezeptoren zeigt sich an der drastischen Hemmung des GRs durch Überexpression eines Proteinfragments, das nur aus einer TPR-Domäne besteht (Chen et al., 1996).

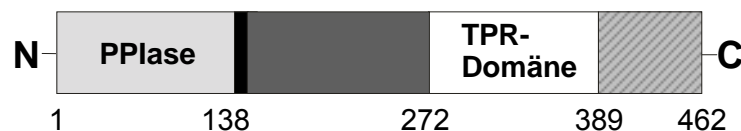


Abb. 5: Domänenstruktur von FKBP51 und FKBP52

hellgrau: PPlase-Domäne, schwarz: Bereich der bei FKBP52 möglicherweise für GR Bindung verantwortlich ist, FKBP51 fehlen in diesem Teil 2 AS, weiß: TPR-Bindungs-Domäne, schraffiert: Calmodulin-Bindungs-Domäne. Die AS-Angaben beziehen sich auf FKBP52; FKBP51 besitzt 2 AS weniger.

1.5.2.1 FKBP52

FKBP52 wurde als Immunophilin im Hsp90-Heterokomplex identifiziert (Tai et al., 1992) und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Namen bezeichnet (Hsp56, p59, HBI, FKBP59, FKBP52). Es ist in seiner Domänenstruktur dem FKBP51 sehr ähnlich (Abb. 5). Beide Proteine bestehen aus der N-terminal lokalisierten PPlase-Domäne, die bei

FKBP52 zu 49% identisch mit FKBP12 ist (Callebaut et al., 1992; Lebeau et al., 1992; Chambraud et al., 1993). Außerdem wurde berichtet, daß diese Domäne für die Interaktion von FKBP52 mit Dynein wichtig ist (Silverstein et al., 1999; Galigniana et al., 2001; Galigniana et al., 2002). Die darauffolgende Domäne stimmt nur zu 28% mit FKBP12 überein und es wurde nur eine marginale PPIase-Aktivität festgestellt (Chambraud et al., 1993). Im C-terminalen Bereich findet sich die aus drei Repeats bestehende TPR-Domäne, die für die Hsp90-Bindung nötig ist (Owens-Grillo et al., 1996). Die letzte Domäne ist die Calmodulin-Bindungsstelle (Massol et al., 1992; Lebeau et al., 1992).

FKBP52 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert (Czar et al., 1995). Seine Expression kann durch zellulären Stress, wie Hitze oder Chemikalien, induziert werden, was es als Hitzeschockprotein definiert (Sanchez, 1990). FKBP52 kann vermutlich direkt mit dem GR interagieren (Owens-Grillo et al., 1996). Vergleicht man die Sequenzen von GR und FKBP52, stellt man fest, daß die Sequenz EDLTDED von FKBP52 (AS 139-146) (vgl. Abb. 5 schwarzer Bereich) elektrostatisch zur NL1-Abfolge RKTKKKIK im GR (AS 510-517) komplementär ist. Diese Sequenzabfolge scheint konserviert zu sein. FKBP51 besitzt diese Abfolge hingegen nicht (Baughman et al., 1995). Mittels rekombinanter Proteine konnte die Interaktion von GR und FKBP52 nachgewiesen werden, allerdings konnte die genaue Interaktionsstelle noch nicht lokalisiert werden. Weder die PPIase-Domäne von FKBP52 noch die TPR-Domäne von PP5 können die Bindung an den GR inhibieren (Silverstein et al., 1999).

Vor kurzem wurde in Hefe gezeigt, die GR-vermittelte Transaktivierung durch Expression von FKBP52 erhöht wird und daß die PPIase-Aktivität von FKBP52 für diesen Effekt benötigt wird (Riggs et al., 2003). In Hefe scheint die Dyneinbindung von FKBP52 allerdings ohne Bedeutung zu sein, weil die GR-stimulierende Wirkung auch in einem Hefestamm ohne Dynein beobachtet wurde (Riggs et al., 2003).

1.5.2.2 FKBP51

FKBP51 wurde zuerst im Komplex mit dem Progesteronrezeptor (PR) identifiziert (Smith et al., 1990) und zeigt ca. 60% Sequenzidentität mit FKBP52. Anders als FKBP52 kann FKBP51 unabhängig von Ca^{2+} und FK506 an Calcineurin binden (Li et al., 2002). FKBP51 kann im Gegensatz zu FKBP52 nicht durch Hitze induziert werden. Die Expression von FKBP51 ist stark hormonabhängig (Hubler et al., 2003; Vermeer et al., 2003; Baughman et al., 1997). Wie auch FKBP52 bindet FKBP51 über seine TPR-Domäne an Hsp90, dabei verstärken bei FKBP51 die letzten C-terminalen AS die Bindung an Hsp90, während der korrespondierende Teil von FKBP52 die Bindungsaffinität an Hsp90 verringert (Cheung-Flynn et al., 2003; Barent et al., 1998). Die Bindung der TPR-Proteine an Hsp90 erfolgt nicht

nur über das konservierte MEEVD-Motiv von Hsp90 sondern es sind zusätzlich noch unterschiedliche AS für diese Interaktion notwendig (Ramsey et al., 2000).

Biochemische Untersuchungen der Bindung zwischen Hsp90 und den TPR-Proteinen zeigten auch Unterschiede in den Bindungsaffinitäten (FKBP52 > FKBP51 > Cyp40) (Pirkl und Buchner, 2001a). Allerdings haben die einzelnen Immunophilinen offenbar auch spezifische Interaktionsoberflächen mit den verschiedenen Rezeptoren. So wird z.B. der Progesteronrezeptor (PR) in vitro bevorzugt mit FKBP51 assoziiert gefunden, obwohl fünfmal höhere Proteinmengen von FKBP52 vorhanden waren (Nair et al., 1997). In vitro-Experimente zeigten, daß in GR-Komplexen FKBP51 bevorzugt gegenüber FKBP52 und Cyp40 eingebaut wird (Nair et al., 1997; Barent et al., 1998). Untersuchungen an Lymphozyten aus Totenkopffäffchen (*Saimiri boliviensis boliviensis*) haben gezeigt, daß die Bindungsaffinität des GRs um ein 11-faches reduziert ist, wenn FKBP51 im Komplex zu finden ist (Reynolds et al., 1999). Weitere Experimente in COS-Zellen belegten, daß FKBP51 ein Inhibitor der GR-vermittelten Transaktivierung ist (Denny et al., 2000).

1.5.3 p23

p23 ist das kleinste Protein im Hsp90-Heterokomplex ($M_r = 18000-25000$), mit einer relativ einfachen chemischen Struktur (Weikl et al., 1999; Weaver et al., 2000). Es besteht aus 8 β -Faltblattstrukturen, die antiparallel ein kompaktes β -Sandwich bilden. Der C-Terminus konnte in der Kristallstrukturanalyse nicht aufgelöst werden und ist wahrscheinlich unstrukturiert. Viele konservierte AS liegen auf einer Seite der Oberfläche der Struktur und sind möglicherweise für die Interaktion mit anderen Proteinen nötig, wie z.B. Hsp90 (Weaver et al., 2000). p23 ist ubiquitär und in unterschiedlichen Spezies evolutionär hochkonserviert. Es wurde zuerst als Teil des Hsp90-PR-Komplexes identifiziert (Johnson et al., 1994), ist aber mittlerweile in vielen anderen Hsp90-Substrat-Komplexen gefunden worden. Die Bindung an Hsp90 ist nur in Gegenwart von ATP möglich (Sullivan et al., 1997). Geldanamycin verdrängt p23 aus dem Komplex, da es die ADP-gebundene Konformation von Hsp90 imitiert (Stebbins et al., 1997; Prodromou et al., 1997). Der Interaktion von p23 mit Hsp90 wirkt auch Hop entgegen, weil es den Eintritt von ATP in den Komplex verhindert (Prodromou et al., 1999). Es wurde berichtet, daß humanes p23 die ATPase-Aktivität von Hsp90 hemmt (McLaughlin et al., 2002), während das p23 der Hefe keinen Einfluß zu haben scheint (Young und Hartl, 2000).

p23 wird auch eigene Chaperonaktivität zugeschrieben, da es die Aggregation von denaturierten Proteinen hemmen kann (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996). Deletion des C-terminalen Teils von p23 führt zum Verlust der Chaperon-Aktivität, während die Hsp90-Bindung erhalten bleibt (Weikl et al., 1999; Weaver et al., 2000). Die Funktion von

p23 konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden. Es wurde berichtet, daß p23 in vitro die Faltung des GR fördert (Hutchison et al., 1995), obwohl es nicht essentiell ist, um den GR in eine hormonbindungsfähige Konformation zu bringen (Rajapandi et al., 2000). p23 scheint auch das ATP-abhängige Ablösen des Substrats von Hsp90 zu stimulieren (Young und Hartl, 2000). Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, daß die Erhöhung der p23 Menge die Ligandeneffizienz verschiedener Steroidrezeptoren beeinflusst. So wurde z.B. die Aktivität des GRs erhöht, während die des MRs reduziert wurde (Freeman et al., 2000). Allerdings wurde kein Effekt auf die Ligandenwirksamkeit festgestellt. Ein Hefestamm ohne p23/Sba1 zeigte nur eine geringe Beeinflussung des Wachstums aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Ansamycinen wie Geldanamycin (Bohen, 1998; Fang et al., 1998).

Die neusten Untersuchungen deuten auf einen nukleären Effekt von p23 hin. So führten erhöhte Mengen an p23 zu einem Auseinanderfallen von regulatorischen Transkriptionskomplexen (Freeman und Yamamoto, 2002). Die Transkriptionsaktivitäten des GRs und des Thyroxinrezeptors wurden durch p23 reduziert, ebenso die von anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B. Zusätzlich verminderte p23 in vivo die Anzahl der mit GR besetzten GREs. Hsp90 zeigte generell ähnliche Effekt wie p23, was schließlich die Frage aufwirft, ob der beobachtete Effekt von p23 direkt durch die eigene Chaperonaktivität von p23 verursacht wird, oder ob er ein Resultat der Funktion von p23 als Hsp90-Cochaperon ist.

1.6 Problemstellung

Trotz zahlreicher Studien ist die Funktionsweise und der Wirkmechanismus der einzelnen Komponenten des Hsp90-Heterokomplexes nicht ausreichend geklärt. Vor allem die Rolle der TPR-Proteine wirft viele Fragen auf. Der Hsp90-Komplex ist in niederen und höheren Organismen zwar strukturell und funktionell konserviert, doch ist hierbei nicht auszuschließen, daß die einzelnen Proteine im Laufe der Zeit in höheren Eukaryonten zusätzliche Aufgaben übernommen haben. So hat sich z.B. in den Hefen kein Signaltransduktionsweg für Steroide entwickelt, der aber bei höheren Lebewesen von grundlegender Bedeutung ist. Daher erscheint es zweifelhaft, daß alle Funktionen der TPR-Proteine in Hefen untersucht werden können. Ziel der Arbeit war es, die Funktion der beiden Immunophilinen FKBP51 und FKBP52 in der GR-vermittelten Transaktivierung in menschlichen Zellen zu untersuchen. Nach den ersten Experimenten wurde festgestellt, daß die beiden Proteine trotz ihrer hohen strukturellen Homologie sehr unterschiedlich auf den GR wirken. Es stellte sich nun die Aufgabe, den Grund für diese unterschiedliche Funktion zu untersuchen und festzustellen, ob es sich dabei um einen spezifischen Effekt auf den GR handelt oder ob auch andere Steroidrezeptoren beeinflusst werden.

Die Funktion und Bedeutung von p23 ist bislang nur unvollständig geklärt. Der vor kurzem publizierte nukleäre Effekt von p23 konnte nicht klären, ob p23 Steroidrezeptoren über seine eigene Chaperonaktivität oder als Cochaperon von Hsp90 beeinflusst. Ziel war es nun, über geeignete Mutationen diese beiden Aktivitäten voneinander zu differenzieren und zu untersuchen, welche der beiden Funktionen für den Effekt auf den GR wichtig ist. Da bereits bekannt war, daß die Chaperonaktivität von p23 im C-terminalen Teil lokalisiert ist, mußten nun geeignete Mutanten entwickelt werden, die nicht mehr mit Hsp90 interagieren können. Schließlich sollte die Arbeit einen Beitrag leisten, um eine mögliche genetische Komponente im Bereich der Chaperone zu beleuchten, die bei der Entstehung und Heilung der Depression von Bedeutung sein könnte.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (37,5% mit 1% Bisacrylamid)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Adenosin 5'-Triphosphat	Sigma (St. Louis, USA)
AG 1-X8 Resin	Bio-Rad Laboratories (München)
Agarose SeaKem	Biozym (Oldendorf)
Aktivkohle	Sigma (St. Louis, USA)
Albumin bovine	Sigma (St. Louis, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Borsäure	Calbiochem (San Diego, Kalifornien)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Chloroform	Sigma (St. Louis, USA)
Comassie Serva Blue R	Serva (Heidelberg)
Cortisol (17-Hydroxycorticosteron)	Sigma (St. Louis, USA)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Dexamethason	Sigma (St. Louis, USA)
Dextran T70	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
DTT (1,4- Dithiotreit)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
ECL-Westernblot-Detektionssystem	Amersham Buchler (Braunschweig)
EDTA	Sigma (St. Louis, USA)
Einbettmedium Pro taps Mount Fluor	Quartett Immundiagnostika (Berlin)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs)
FK506	Calbiochem (San Diego, Kalifornien)
Fludrocortisone acetate	Sigma (St. Louis, USA)
Gelantine	Sigma (St. Louis, USA)
Hefe-Extrakt	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Kodak GBX Developer	Sigma (St. Louis, USA)
Kodak GBX Fixer	Sigma (St. Louis, USA)
LB broth	Sigma (St. Louis, USA)
Luciferin	Roche Diagnostics (Mannheim)
MOPS	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
NPTG (6-Nitrophenyl- β -D-Galactopyransid)	Sigma (St. Louis, USA)

Phenol	Sigma (St. Louis, USA)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma (St. Louis, USA)
Ribonuclease	Sigma (St. Louis, USA)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs)
Sodium(meta)arsenit	Fluka (Buchs)
Stripping-Puffer	Pierce (Bonn)
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethyldiamin)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Tetracyclin	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Riedel-de Haen (Seelze)
Triton X-100	Sigma (St. Louis, USA)
Trypton	BD Biosciences (Heidelberg)
TWEEN20	Sigma (St. Louis, USA)
X-Gal	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Zeocin	Invivogen (San Diego, USA)

Chemikalien, die hier nicht vermerkt sind, stammten von der Firma Merck (Darmstadt).

2.2 Enzyme

Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt am Main) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
rTEV Protease	Invivogen (San Diego)
Pwo-DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Taq-DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Polynukleotidkinase (PNK)	Roche Diagnostics (Mannheim)

2.3 Marker

Kaleidoskop prestained Standards	Bio-Rad Laboratories (München)
DNA-Leiter Mix	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Lamda-DNA HindIII Digest	NEB (Frankfurt am Main)
PhiX174 DNA-HaeIII Digest	NEB (Frankfurt am Main)

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Name	Verd.	Isotyp	Bezugsquelle
Aktin (I-19)	1:2000	goat IgG	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)
anti-dynein (clone 70.1)	1:1000	mouse IgM	Sigma (St. Louis, USA)
anti-FKBP54/FKBP51	1:2000	mouse IgG1	StressGen Biotechnologies (Kanada)
anti-FKBP59/FKBP52	1:2000	mouse IgG	StressGen Biotechnologies (Kanada)
anti-FLAG M2	1:5000	mouse IgG1	Sigma (St. Louis, USA)
anti-HA	1:2000	rat IgG	Roche Diagnostics (Mannheim)
anti-p23	1:2000	mouse IgG1	ABR Affinity BioReagents (Golden)
anti-PP5 / PPT	1:2000	mouse IgG1	BD Transduction Laboratories (Kanada)
GFP (B-2)	1:2000	mouse IgG2a	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)
GR (H-300)	1:2000	rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)
Hsp90 (H-114)	1:2000	rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)
HSTF1 (H-311)	1:2000	rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)

2.4.2 Sekundäre Antikörper, Peroxidase gekoppelt

Name	Verd.	Wirtstier	Bezugsquelle
anti-goat IgG	1:2000	Esel	Santa Cruz Biotechnology (Kalifornien)
anti-mouse IgG	1:2000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
anti-mouse IgM	1:1000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
anti-rabbit IgG	1:2000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
anti-rat IgG	1:2000	Kaninchen	Sigma (St. Louis, USA)

2.5 Bakterien

Die Escherichia coli (E.coli) DH5 α wurden einmal kommerziell bei Invitrogen (Karlsruhe) erstanden und zur Plasmidisolierung verwendet. Die GT116-Bakterien sind von der Firma Invivogen (San Diego, USA) und wurden zur Anzucht von Plasmiden, die eine Haarschleifen-Struktur ausbilden, wie z.B. bei der RNAi-Methode, genutzt. Zur Proteinexpression wurden die E.coli BL21(DE3)pLysS (Stratagene, Amsterdam) verwendet, die eine hohe Expressionsrate von rekombinanten Proteinen zeigen.

Bakterienstamm	Genotyp
DH5 α	F ϕ 80LacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ ;m _r ⁺) phoA supE44 thi-1gyrA96relA1
GT116	F ⁻ mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 recA1 endA1 DsbcC-sbcD
BL21(DE3)pLysS	E.coli B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ ;m _B ⁻) gal β (DE3)[pLysS Cam ^r]

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zelllinien

COS-1	ATCC CRL1650	Nierenzellen eines Affen
HEK 293	ATCC CCL1573	humane Nierenzellen
HeLa	ATCC CCL2	humane Tumor-Zelllinie
HeLa TREx	Invitrogen (Karlsruhe)	HeLa Zellen, die stabil einen Tetracyclinrepressor exprimieren
MCF-7	ATCC HTB22	humane Mammakarzinom
Sk-N-MC	ATCC HTB10	humane neuroblastoma Zelllinie

2.6.2 Medien für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)

Dulbecco's Medium w/o Phenol red

100x Antibiotic-Antimycotic

100mM Sodium Pyruvat

10x PBS
 10x Trypsin-EDTA Solution
 10x EBSS
 Foetal Bovine Serum

2.7 Plasmide

2.7.1 Rezeptor-, Reporter-, allgemeine Plasmide

Name	Verwendung	Referenz
PRK5-SV40PUR	Expressionsvektor für Säugetierzellen mit einem humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, und einer Ampicillin- und Puromycin-Resistenz	(Spengler et al., 1993)
pRK5-SV40MCS	Vektor mit einem CMV-Promotor und einer multiplen Klonierungsstelle, Ampicillin-Resistenz und Puromycin-Resistenz, zur Herstellung stabiler Zelllinien	Diese Arbeit <u>Klonierungsstrategie:</u> aus pRK5-SV40PUR geschnitten mit EcoRI und HindIII; Ligation mit annealten Oligos pRK5MCS1 und pRK5MCS2
MTV-Luc	Luciferase als Reportergen unter der Kontrolle eines MMTV (<u>m</u> ouse <u>m</u> ammery <u>t</u> umor <u>v</u> irus)-Promotors, induzierbar durch GR, MR, PR, AR Ampicillin-Resistenz	(Hollenberg und Evans, 1988)
pCMV-βGal	Kontrollplasmid für Transfektionseffizienz, β-Galaktosidase mit CMV-Promotor und Ampicillin-Resistenz	Stratagene (La Jolla)
pRK7-GR	Expression von humanen GR in Säugetierzellen unter Kontrolle eines SV40-Promotors, Ampicillin-Resistenz	Plasmid erhalten von D. Spengler (Hollenberg et al., 1985)
pRK7-GR 1-515-HA	Expression in Säugetierzellen von humanem GR AS1-515, N-terminal fusioniert mit einem HA-Tag unter Kontrolle eines SV40-Promotors,	Plasmid erhalten von D. Spengler

	Ampicillin-Resistenz	
pRK7-GR-FLAG	Expression in Säugertierzellen von humanem GR, N-terminal fusioniert mit einem FLAG-Epitop unter Kontrolle eines SV40-Promotors, Ampicillin-Resistenz	Diese Arbeit <u>Klonierungsstrategie:</u> PRK7-GR geschnitten mit XbaI und PpuMI und pRK7-GR amplifiziert mit NtermFLAGGR und PpuMIGR
pRK7-GR-HA	Expression in Säugertierzellen von humanem GR, N-terminal fusioniert mit einem HA-Epitop unter Kontrolle eines SV40-Promotors, Ampicillin-Resistenz	Plasmid erhalten von D. Spengler
PEGFP-C1	Der Vektor kodiert eine in den rot-Bereich verschobene Variante des Wild-Typ GFPs, Gene die in den Leserahmen des Vektors in die MCS kloniert werden, können N-terminal fusioniert mit der GFP-Variante in Säugertierzellen exprimiert werden. Kanamycin-Resistenz	Clontech (San Jose, USA)
GFP-GR	Expression in Säugertierzellen von humanem GR, fusioniert N-terminal mit GFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Kanamycin-Resistenz	Diese Arbeit <u>Klonierungsstrategie:</u> PEGFP-C1 geschnitten mit XhoI und KpnI pRK7GR amplifiziert mit GFPGRupstr und GFPGRdown
GFP-GR 1-515	Expression in Säugertierzellen von trunziertem, humanem GR (AS1-515) fusioniert mit einem N-terminalen GFP-Epitop unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Kanamycin-Resistenz	Diese Arbeit <u>Klonierungsstrategie:</u> PEGFP-C1 geschnitten mit XhoI und BamHI, blunt pRK7GR amplifiziert mit GFPGRupstr und PfIMIGR515
pRK7-MR-HA	Expression in Säugertierzellen von humanem MR, fusioniert mit einem N-terminalen HA-Epitop unter Kontrolle eines SV40-Promotors,	cDNA ursprünglich erhalten von A. Alléra, umkloniert von Anke Hoffmann mit

	Ampicillin-Resistenz	einem HA-Tag
GFP-MR	Expression in Säugertierzellen von humanem MR, fusioniert mit einem N-terminalen GFP-Epitop unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Kanamycin-Resistenz	Plasmid erhalten von O. Almeida and T. Michaelidis
psiRNA	RNA-Polymerase III basierender Expressionsvektor, der die Produktion von kurzer Doppelstrang-RNA mit Haarschleifenstruktur in humanen Zellen ermöglicht, Zeocin-Resistenz	Invivogen (San Diego)
ERE-Luc	Luciferase als Reportergen unter Kontrolle eines Promotors, der Estrogen responsive Elemente enthält, Ampicillin-Resistenz	Plasmid erhalten von C. Behl, ursprünglich ein Geschenk von P. Chambon
HSE-Luc	Luciferase als Reportergen unter Kontrolle eines durch HSF-1 induzierbaren Promotors, Ampicillin-Resistenz	Plasmid erhalten von C. Winklhofer cDNA ursprünglich von R. Voellmy (Voellmy et al., 1985; Zuo et al., 1995; Winklhofer et al., 2001)
CMV-AR	Expression in Säugertierzellen von humanem Androgenrezeptor (AR), fusioniert mit einem HA-Epitop unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Ampicillin-Resistenz	cDNA ursprünglich erhalten von R. Evans, umklont von Anke Hoffmann mit einem HA-Tag
CMV-PR	Expression in Säugertierzellen von humanem Progesteronrezeptor (PR), fusioniert mit einem HA-Epitop unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Ampicillin-Resistenz	cDNA ursprünglich erhalten von R. Schüle, umklont von Anke Hoffmann mit einem HA-Tag
CMV-ER	Expression in Säugertierzellen von humanem Estrogenrezeptor (ER) unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Ampicillin-Resistenz	Plasmid erhalten von C. Behl
CMV-PP5-FLAG	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, cDNA der Protein-Phosphatase 5 unter Kontrolle eines CMV-Promotors, fusioniert N-terminal mit einem FLAG-Epitop, Ampicillin-Resistenz	Plasmid von M. Chinkers erhalten
pcDNA6/TR	Expression eines Tetracyclinrepressors unter Kontrolle eines CMV-Promotors, Ampicillin-	Invitrogen (Karlsruhe)

	Resistenz	
pcDNA4/TO	Klonierungsvektor des TReX-Systems, zur induzierbaren Expression von Genen, die durch einen CMV-Promotor mit 2 Tet Operator (TetO ₂)-Sequenzen reguliert werden. Bei Cotransfektion eines Tetracyclinrepressors ist die Expression unterdrückt. Tetracyclin bindet an den Repressor und induziert so die Transkription, Ampicillin-Resistenz	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA4/TO/ LacZ	Vektor des TReX-Systems zur induzierbaren Expression von β -Galactosidase durch Tetracyclin bei Coexpression eines Repressors, Ampicillin-Resistenz	Invitrogen (Karlsruhe)
pPRO-ExHTa	Expressionsplasmid für Prokaryonten zur Isolierung von Proteinen die N-Terminal an ein His-Epitop fusioniert sind; die Expression des Proteins kann durch IPTG induziert werden Ampicillin-Resistenz	Invitrogen (Karlsruhe)

2.7.2 FKBP-Plasmide

Name	Klonierungsstrategie	Beschreibung
pRK5-FKBP51FLAG	Vektor pRK5-SV40PUR geschnitten mit EcoRI und HindIII/blund cDNA amplifiziert mit FKBP51START und FKBP51STOPFLAG	Expression von FKBP51 fusioniert mit C-terminalen FLAG
pRK5-FKBP52FLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund cDNA amplifiziert mit FKBP52XhoI START und FKBP52STOPFLAG	Expression von FKBP52 fusioniert mit C-terminalen FLAG
pRK5-FKBP51	Vektor pRK5-SV40PUR geschnitten mit EcoRI und HindIII/blund cDNA amplifiziert mit FKBP51START und FKBP51END	Expression von FKBP51
pRK5-FKBP52	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund	Expression von FKBP52

	cDNA amplifiziert mit FKBP52XhoI START und FKBP52END	
pRK5-FKBP51TPR-FLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP51START und FKBP51TPRMut352/358 rev 2. cDNA amplifiziert mit FKBP51TPRMut 352/358vor und FKBP51STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP51START und FKBP51STOPFLAG 	Expression von FKBP51 mit mutierter TPR-Domäne fusioniert mit C-terminalen FLAG
PRK5-FKBP51-PPIaseFLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP51XhoI START und FKBP51PPIMUTvor 2. cDNA amplifiziert mit FKBP51PPIMUT rev und FKBP51 STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP51XhoI START und FKBP51 STOPFLAG 	Expression von FKBP51 mit mutierter PPIase-Domäne fusioniert mit C-terminalen FLAG
PRK5-FKBP52-PPIaseFLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP52XhoI START und FKBP52PPIMUTvor 2. cDNA amplifiziert mit FKBP52PPIMUT rev und FKBP52 STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP52XhoI START und FKBP52 STOPFLAG 	Expression von FKBP52 mit mutierter PPIase-Domäne fusioniert mit C-terminalen FLAG
pRK5-FKBP51PPI-52FLAG (Ch1)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP51XhoI START und 51 PPIrev 2. cDNA amplifiziert mit 51PPI-52 und FKBP52 STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP51XhoI START und FKBP52 	Chimäres aus FKBP51 PPIase Domäne (AS 1-) fusioniert mit C-terminalen Teil von FKBP52

	STOPFLAG	
pRK5-FKBP52PPI-51FLAG (Ch2)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP52XhoI START und 52 PPIrev 2. cDNA amplifiziert mit 52PPI-51 und FKBP51 STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP52XhoI START und FKBP51 STOPFLAG 	Chimäres aus FKBP52 PPIase Domäne (AS 1-138) fusioniert mit C-terminalen Teil von FKBP51
pRK5-FKBP51-52 Cal FLAG (Ch3)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit FKBP51XhoI START und 51vorCalrev 2. cDNA amplifiziert mit 51-52Cal und FKBP52STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP51XhoI START und FKBP52 STOPFLAG 	Chimäres aus FKBP51 mit Calmodulin-Bindungs-Domäne von FKBP52 (AS 399-459) fusioniert FLAG-Epitop
pRK5-FKBP51-52 TPR FLAG (Ch4)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. FKBP51 amplifiziert mit FKBP51XhoI START und FKBP51.5 2. Ch3 amplifiziert mit 52-51TPR und FKBP52STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP51XhoI START und FKBP52STOPFLAG 	Chimäres aus FKBP51 mit TPR-Domäne von FKBP52 (AS 272-389) fusioniert mit FLAG-Epitop
pRK5-FKBP52-51TPR/Cal-FLAG (ChA)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. FKBP51 amplifiziert mit FKBP51STOPFLAG und 52-51TPR 2. FKBP52 amplifiziert mit FKBP52XhoI START und FKBP52.5 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit 	Chimäres aus FKBP52 mit TPR-Domäne und Calmodulin-Domäne von FKBP51 fusioniert FLAG-Epitop

	FKBP52XhoI START und FKBP52 STOPFLAG	
pRK5-FKBP52-51 TPR FLAG (Ch5)	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit XhoI und HindIII/blund <ol style="list-style-type: none"> 1. FKBP52 amplifiziert mit 51TPR-52 und FKBP52STOPFLAG 2. ChA amplifiziert mit FKBP52XhoISTART und 51TPRrev 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit FKBP52XhoI START und FKBP52 STOPFLAG 	Chimäres aus FKBP52 mit TPR-Domäne von FKBP51 (AS 270-387) fusioniert FLAG-Epitop
psiRNAseq1 (seq1)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq1for mit Oligo psiRNAseq1rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Expression Doppelstrang-RNA mit einer Haarschleifenstruktur, wobei der Doppelstrangbereich homolog zu FKBP52 ist
psiRNAseq1 mut (seq1mut)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq1mut-for mit Oligo psiRNAseq1mut-rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Kontrolle der Spezifität von psiRNAseq4, da Sequenz nicht homolog zu FKBP52 d.h. sollte nicht zu RNAi führen
psiRNAseq3 (seq3)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq3for mit Oligo psiRNAseq3rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Expression Doppelstrang-RNA mit einer Haarschleifenstruktur, wobei der Doppelstrangbereich homolog zu FKBP52 ist
psiRNAseq3 mut (seq3 mut)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq3mut-for mit Oligo psiRNAseq3mut-rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Kontrolle der Spezifität von psiRNAseq4, da Sequenz nicht homolog zu FKBP52 d.h. sollte nicht zu RNAi führen
psiRNAseq2 (seq2)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq2for mit Oligo psiRNAseq2rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Expression Doppelstrang-RNA mit einer Haarschleifen-

		struktur, wobei der Doppelstrangbereich homolog zu FKBP52 ist
psiRNAseq2 mut (seq2 mut)	Vektor psiRNA geschnitten mit BbsI Oligo psiRNAseq2mut-for mit Oligo psiRNAseq2mut-rev annealen und in den Vektor ligieren	Plasmid zur Kontrolle der Spezifität von psiRNAseq4, da Sequenz nicht homolog zu FKBP52 d.h. sollte nicht zu RNAi führen
pPROEx-FKBP51FLAG	Vektor pPROEX H1 geschnitten mit NcoI und XbaI cDNA amplifiziert mit FKBP51HIS-NcoI und FKBP51-FLAG-Xba-STOP	Plasmid zur Aufreinigung von FKBP51FLAG über His-Tag
pPROEx-FKBP52FLAG	Vektor pPROEX H1 geschnitten mit NcoI und XbaI cDNA amplifiziert mit FKBP52HIS-NcoI und FKBP52-FLAG-Xba-STOP	Plasmid zur Aufreinigung von FKBP52FLAG über His-Tag

2.7.3 p23-Plasmide

Name	Klonierungsstrategie	Verwendung
pRK5-p23	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt cDNA amplifiziert mit p23START und P23STOP	Expression von p23 in Säugetierzellen
pRK5-p23FLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt cDNA amplifiziert mit p23START und p23 STOPFLAG	Expression von p23, C-terminal fusioniert mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23ANNAFLAG	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und HindIII/blunt 1. cDNA amplifiziert mit p23START und ANNArev 2. cDNA amplifiziert mit ANNAvor und p23STOPFLAG	Expression der p23-ANNA Mutante, C-terminal fusioniert mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen

	<p>3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit Primer p23START und p23STOPFLAG</p>	
pRK5-p23ANNWFLAG	<p>Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und HindIII/blunt</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit p23START und P23ANNWrev 2. cDNA amplifiziert mit P23ANNWvor und p23STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. mit Oligos p23START und p23STOPFLAG 	Expression der p23-ANNW Mutante, fusioniert C-terminal mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23FNNAFLAG	<p>Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und HindIII/blunt</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit p23START und P23FNNArev 2. cDNA amplifiziert mit p23FNNAvor und p23STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. p23START und p23STOPFLAG 	Expression der p23-FNNA Mutante, fusioniert C-terminal mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23delta86-108FLAG	<p>Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und HindIII/blunt</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cDNA amplifiziert mit p23START und 86-108rev 2. cDNA amplifiziert mit delta86-108vor und p23STOPFLAG 3. PCR Produkte aus 1. und 2. p23START und p23STOPFLAG 	Expression von p23- Δ 86-108, fusioniert C-terminal mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23C35FLAG	<p>Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt</p> <p>cDNA amplifiziert mit p23START und p23-C35</p>	Expression von p23-C35 fusioniert C-terminal mit einem FLAG-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23HA	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt	Expression von p23 fusioniert C-terminal mit

	cDNA amplifiziert mit p23START und p23HAstop	einem HA-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23ANNA-HA	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt pRK5-p23ANNAFLAG amplifiziert mit p23START und p23HAstop	Expression der p23ANNA Mutante fusioniert C-terminal mit einem HA-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23ANNW-HA	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt pRK5-p23ANNWFLAG amplifiziert mit p23START und p23HAstop	Expression der p23ANNW Mutante fusioniert C-terminal mit einem HA-Tag in Säugetierzellen
pRK5-p23FNNA-HA	Vektor pRK5-SV40MCS geschnitten mit EcoRI und Hind/blunt pRK5-p23FNNAFLAG amplifiziert mit p23START und p23HAstop	Expression der p23FNNA Mutante fusioniert C-Terminal mit einem HA-Tag in Säugetierzellen
pPROex-p23FLAG	Vektor pPROEX H1 geschnitten mit NcoI und XbaI pRK5-p23FLAG amplifiziert mit p23HISNcoI und p23-FLAG-Xba-STOP	Expression von p23- FLAG in Bakterien und Aufreinigung des Proteins über einen His-Tag
GFP-p23	Vektor pEGFP-C1 geschnitten mit XhoI und BamHI/blunt pRK5-p23FLAG amplifiziert mit GFPp23upstr und P23FLAGSTOP	Expression von p23-FLAG fusioniert N-Terminal mit GFP zur Lokalisation in HeLa-Zellen

2.8 Oligos und Primers

Start- und Stopcodons sind fett hervorgehoben. Entsprechende Schnittstellen sind umrahmt dargestellt. Bei Oligos, die zur Herstellung bestimmter Mutanten verwendet wurden, sind die entsprechend mutierten Basen klein geschrieben.

2.8.1 FKBP-Oligos

2.8.1.1 FKBP51 und Chimäre

Name	Sequenz 5'-3'	Pos. in Genbank-Nr.	Klonierungsstrategie
FKBP51XhoI START	GGA CTC GAG ATA TGA CTA CTG ATG AAG G	154-170 in U71321	Start für FKBP51, XhoI-Schnittstelle
FKBP51START	CCA GAA TTC ATA TGA CTA CTG ATG AAG G	154-170 in U71321	Start für FKBP51, EcoRI-Schnittstelle
FKBP51END	AAT GGA TCC GAT ATC ATA CGT GGC CCT CAG	1511-1527 in U71321	Stop Primer für FKBP51 oder Mutaten
FKBP51 STOPFLAG	TT G GAT CC T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCT ACG TGG CCC TCA GGT TTC TC	1504-1524 in U71321	Stop Primer für -FKBP51 mit FLAG BamHI-Schnittstelle
FKBP51-FLAG- Xba-STOP	GG T CTA GAT T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCT ACG TGG CCC TCA GGT TTC TC	1504-1524 in U71321	Stop Primer für FKBP51FLAG His Klone, XbaI-Schnittstelle
FKBP51HIS-NcoI	CAT GCA TG C CAT GG C AAT GAC TAC TGA TGA AGG TGC C	154-174 in U71321	Start für FKBP51, NcoI-Schnittstelle
FKBP51PPIMUT rev	GGT TCA TTT CTA TCA TGA CTG GAA <u>aCA</u> <u>tc</u> C TTC TTT CCA TTT GAC AAT TTT CC	328-380 in U71321	3'-Primer für PPIase Mutante von FKBP51, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben

FKBP51PPIMUT vor	GGA AAA TTG TCA AAT GGA AAG AAG <u>gaT</u> <u>GtT</u> TCC AGT CAT GAT AGA AAT GAA CC	328-380 in U71321	5'-Primer für PPlase Mutante von FKBP51 mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
FKBP51TPRMut 352/358vor	GCC AAT GAG <u>gcA</u> GGC TTG TAT <u>gcG</u> AGG GGT GAA GCC CAG CTG C	1198-1240 in U71321	5'-Primer für TPR Mutante von FKBP51 mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
FKBP51TPRMut 352/358 rev	GCA GCT GGG CTT CAC CCC <u>TcG</u> <u>cAT</u> ACA AGC <u>CTg</u> <u>cCT</u> CAT TGG C	1198-1240 in U71321	3'-Primer für TPR Mutante von FKBP51, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
52PPI-51	<u>GGA GTT GTT TGA GTT</u> <u>TAA GGG</u> AGA GGA TTT ATT TGA AG	568-586 in U71321 495-513 in M88279	5'-Primer für Chimäres 52PPI- 51 (Ch2), Basen von FKBP52 unterstrichen
52PPIrev	CTT AAA CTC AAA CAA CTC C	495-513 in M88279	3'-Primer für 52PPI-51 (Ch2)
51PPI-52	<u>GAG CTC CTT GAT TTC</u> <u>AAA</u> GGA GAA GAT CTG ACG GAA GA	514-533 in M88279 und 550-567 in U71321	5'-Primer für Chimäres 51PPI- 52 (Ch1), Basen von FKBP51 unterstrichen
51 PPIrev	TTT GAA ATC AAG GAG CTC	550-567 in U71321	3'-Primer für 51PPI-52 (Ch1)
52-51TPR	TGG AAC AGA GCA CCA TAG <u>TCA AAG AGA AGG</u> <u>GA</u>	899-915 in M88279 und 964-978 in U71321	5'-Primer für Chimäres 51- 52TRP (Ch4), Basen von FKBP51 unterstrichen
FKBP52.5	GTA GTA AAG CTT GCT TG	957-974 in M88279	3'-Primer für 52-51TRP/Cal (ChA) und für Sequenzierungen von FKBP52
FKBP51.5	TGC ATG TAT TTG CCT C	995-1010 in U71321	3'-Primer für 51-52TRP (Ch4) und Sequenzierungen von FKBP51
51TPR-52	CCC AGA ATA AGG CTG	1298-1314	5'-Primer für Chimäres 52-

	CA <u>AAG A CCC AGC TGG</u> <u>CTG</u>	in U71321 und 1267- 1282 in M88279	51TRP (Ch5), Basen von FKBP52 unterstrichen
51TPRrev	TGC AGC CTT ATT CTG GG	1298-1314 in U71321	3'-Primer für 52-51TRP (Ch5)
51vorCalrev	TTT CTG GCA CAT GGA GAT CTG	1321-1341 in U71321	3'-Primer für Chimäres 51- 52Cal (Ch3),
51-52Cal	TGC AGA TCT CCA TGT GCC AGA AAC <u>GGA TCC</u> <u>GAA GGC AG</u>	1318-1341 in U71321 1294-1308 in M88279	5'-Primer für Chimäres 51- 52Cal (Ch3), Basen von FKBP52 unterstrichen

2.8.1.2 FKBP52

Name	Sequenz 5'-3'	Pos. in Genbank - Nr.	Verwendung
FKBP52XhoIStart	GGA A <u>CT CGA G</u> AT GAC AGC CGA GGA GAT	100-116 in M88279	Start Primer für FKBP52, XhoI-Schnittstelle
FKBP52 STOPFLAG	TT <u>G GAT CC</u> T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCT GCT TCT GTC TCC ACC TGA GA	1456-1476 in M88279	Stop Primer für FKBP52FLAG, BamHI- Schnittstelle
FKBP52END	CGA <u>GAT ATC</u> TAT GCT TCT GTC TC	1465-1479 in M88279	Stop Primer für FKBP52, EcoRV-Schnittstelle
FKBP52-FLAG- Xba-Stop	GG <u>T CTA GA</u> T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCT GCT TCT GTC TCC ACC TGA GA	1456-1476 in M88279	Stop Primer für FKBP52FLAG His-Klone, XbaI-Schnittstelle
FKBP52HIS-NcoI	CAT GCA TG <u>C CAT GG</u> C AAT GAC AGC CGA GGA GAT GAA G	100-120 in M88279	Start Primer für FKBP52, NcoI-Schnittstelle
FKBP52PPImut	GGC TAT TAG ATG GCA	278-318 in	5'-Primer für PPIase Mutante

vor	CAA AG <u>g</u> a <u>TG</u> t <u>CT</u> CCA GTC TGG ATC GC	M88279	von FKBP52, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
FKBP52PPI mut rev	<u>GaC</u> <u>Atc</u> CTT TGT GCC ATC TAA TAG CC	278-303 in M88279	3'-Primer für PPIase Mutante von FKBP52, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
psiRNAseq1for	TCC CAA <u>TAT</u> <u>GtC</u> TAC <u>GGT TCA</u> <u>GtA</u> <u>GCC</u> ACC <u>CTG CTG AAC CGT AGG</u> <u>CAT</u> ATT T	428-448 in M88279	Oligo für RNAi seq1; 19 unterstrichenen Basen homolog zu FKBP52, kleine Buchstaben sind Mutationen um Haarschleifen-Struktur auf DNA-Ebene zu verhindern
psiRNAseq1rev	CAA AAA <u>ATA</u> <u>TGC</u> CTA <u>CGG TTC AGC AGG</u> GTG <u>GCT aCT</u> GAA CCG TAG <u>aCA</u> TAT T	428-448 in M88279	reverses Oligo für RNAi seq1; 19 unterstrichenen Basen homolog zu FKBP52, kleine Buchstaben sind Mutationen um Haarschleifen-Struktur auf DNA-Ebene zu verhindern
psiRNAseq1mut- for	TCC CAA <u>TAT</u> <u>GtC</u> <u>act</u> <u>gtg</u> <u>TCA</u> <u>GtA</u> <u>GCC</u> ACC <u>CTG</u> <u>CTG</u> <u>Aca</u> <u>cgg</u> <u>tGG</u> CAT <u>ATT</u> T	428-448 in M88279	Oligo für RNAi seq1 mutierte; 19 unterstrichenen Basen homolog zu FKBP52, kleine Buchstaben sind Mutationen um Spezifität der Sequenz zu testen
psiRNAseq1mut- rev	CAA AAA <u>ATA</u> <u>TGC</u> <u>Cac</u> <u>cgt</u> <u>gTC</u> <u>AGC</u> <u>AGG</u> GTG <u>GCT aCT</u> <u>GAc</u> <u>aca</u> <u>gtG</u> <u>aCA</u> TAT T	428-448 in M88279	Oligo für RNAi seq1 mutiert; 19 unterstrichenen Basen homolog zu FKBP52, kleine Buchstaben sind Mutationen um Spezifität der Sequenz zu testen
psiRNAseq3for	TCC CAA <u>CAT</u> <u>Tct</u> <u>ATC</u> <u>GTG</u> TAC <u>tTC</u> ACC ACC <u>TGA</u> <u>GGT</u> <u>ACA</u> <u>CGA</u> TGG <u>AAT</u> GTT T	745-763 in M88279	vgl. psiRNAseq1for Oligo für RNAi seq3.
psiRNAseq3rev	CAA AAA <u>ACA</u> TTC CAT	745-763 in	vgl. psiRNAseq1rev

	<u>CGT GTA CCT CAG GTG</u> <u>GTG AaG TAC ACG ATa</u> <u>GAA TGT T</u>	M88279	Oligo für RNAi seq3.
psiRNAseq3mut-for	TCC CAA <u>CAT Tct</u> gag tga <u>TAC aTC ACC ACC TGA</u> <u>GGT Atc gct cGG AAT</u> <u>GTT T</u>	745-763 in M88279	vgl. psiRNAseq1mut-for Oligo für RNAi seq3 mutiert.
psiRNAseq3mut-rev	CAA AAA <u>ACA TTC</u> Cga gcg a <u>TA CCT CAG</u> GTG <u>GTG AAG TA</u> t cac tca <u>GAA</u> <u>TGT T</u>	745-763 in M88279	vgl. psiRNAseq1mut-rev Oligo für RNAi seq3 mutiert.
psiRNAseq2for	TCC CAA <u>GGt</u> <u>GTG tTG</u> <u>AAG GTC ATC ACC ACC</u> <u>TGA TGA CCT TCA GCA</u> <u>CGC CTT T</u>	193-211 in M88279	vgl. psiRNAseq1for Oligo für RNAi seq2.
psiRNAseq2rev	CAA AAA <u>AGG CGT GCT</u> <u>GAA GGT CAT CAG</u> GTG <u>GTG ATG ACC TTC AaC</u> <u>ACa CCT T</u>	193-211 in M88279	vgl. psiRNAseq1rev Oligo für RNAi seq2.
psiRNAseq2mut-for	TCC CAA <u>GGt</u> <u>GTG</u> gaa gtt <u>GTC ATC ACC ACC</u> <u>TGA TGA Cgg ctt cCA</u> <u>CGC CTT T</u>	193-211 in M88279	vgl. psiRNAseq1mut-for Oligo für RNAi seq2 mutiert.
psiRNAseq2mut-rev	CAA AAA <u>AGG CGT</u> Gga agc <u>cGT CAT CAG</u> GTG <u>GTG ATG ACa</u> act tc <u>C</u> <u>ACa CCT T</u>	193-211 in M88279	vgl. psiRNAseq1mut-rev Oligo für RNAi seq2 mutiert.

2.8.2 p23-Oligos

Name	Sequenz 5'-3'	Position in Gen-bank Nr.	Klonierungsstrategie
GFPp23upstr	ATC CTC GAG CTA TGC AGC CTG CTT CTG	233-249 in L24804	Start für GFP-p23 in Vektor pEGFP-C1 XhoI-Schnittstelle

P23STOP	TGC TTA CTC CAG ATC TGG CAT TT	696-715 in L24804	Stop für pRK5-p23 und GFP-p23
p23START	CCA GAA TTC ATA TGC AGC CTG CTT C	233-246 in L24804	Start für pRK5-p23 und pRK5-p23FLAG, sowie alle Mutanten von p23
P23FLAGSTOP	TT G GAT CC T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCC TCC AGA TCT GGC ATT T	696-712 in L24804	Stop für pRK5-p23FLAG und alle p23-FLAG Mutanten, BamHI-Schnittstelle
p23HAstop	TT G GAT CC T CAC GCG TAA TCA GGA ACG TCA TAC GGG TAC TCC AGA TCT GGC ATT T	696-712 in L24804	Stop für pRK5-p23HA und alle p23-HA Mutanten, BamHI-Schnittstelle
P23-FLAG-Xba-STOP	GG T CTA GAT T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCC TCC AGA TCT GGC ATT T	696-712 in L24804	Stop für pPROEX-p23FLAG und alle p23 HIS-Klone, XbaI-Schnittstelle
P23HISNcoI	CAT GCA TG C CAT GG C AAT GCA GCC TGC TTC TGC	233-249 in L24804	Start für pPROEX-p23FLAG und alle p23 HIS-Klone, NcoI-Schnittstelle
P23C35FLAG Xba	GG T CTA GA T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCC TCA GAG AAA CGA TCA AA	590-607 in L24804	Stop für pPROEX-p23C35FLAG HIS-Klone XbaI-Schnittstelle
delta86-108vor	CGA AAA GGA GAA TCT GGC CAG TCA ___ TGG GAA GAT GAT TCA GAT GAA GAC ATG	464-487 und 557-583 in L24804	Für p23deltaAS86-108 5'-Primer, Strich zeigt Deletion an
86-108rev	CAT GTC TTC ATC TGA ATC ATC TTC CCA ___ TGA CTG GCC AGA TTC TCC TTT TCG	464-487 und 557-583 in L24804	Für p23deltaAS86-108 3'-Primer, Strich zeigt Deletion an

ANNAvor	GCT TAA TTG GCT TAG TGT CGA <u>cgC</u> CAA TAA <u>Tgc</u> GAA AGA CTG GGA AGA TGA TTC	517-570 in L24804	Für p23ANNA 5'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
ANNArev	GAA TCA TCT TCC CAG TCT TTC <u>gcA</u> TTA TTG <u>gcG</u> TCG ACA CTA AGC CAA TTA AGC	517-570 in L24804	Für p23ANNA 3'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
p23-C35	TT <u>G GAT CC</u> T CAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCC TCA GAG AAA CGA TCA AA	590-607 in L24804	Stop für pRK5-p23C35FLAG mit BamHI-Schnittstelle
P23-C35oFL	TT <u>G GAT CC</u> T CTT ACT CAG AGA AAC GAT CAA AAT T	587-607 in L24804	Stop für pRK5-p23C35 mit BamHI-Schnittstelle
p23FNNAvor	GCT TAA TTG GCT TAG TGT CGA CTT CAA TAA <u>Tgc</u> GAA AGA CTG GGA AGA TGA TTC	517-570 in L24804	Für p23FNNA 5'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
P23FNNArev	GAA TCA TCT TCC CAG TCT TTC <u>gcA</u> TTA TTG AAG TCG ACA CTA AGC CAA TTA AGC	517-570 in L24804	Für p23FNNA 3'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
P23ANNWvor	GCT TAA TTG GCT TAG TGT CGA <u>cgC</u> CAA TAA TTG GAA AGA CTG GGA AGA TGA TTC	517-570 in L24804	Für p23ANNW 5'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben
P23ANNWrev	GAA TCA TCT TCC CAG TCT TTC CAA TTA TTG <u>gcG</u> TCG ACA CTA AGC CAA TTA AGC	517-570 in L24804	Für p23ANNW 3'-Primer, mutierte AS unterstrichen, ausgetauschte Basen Kleinbuchstaben

2.8.3 sonstige Oligos

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
------	---------------	------------

pRK5MCS1	AAT TCT CGA GAT ATC GGG CCC GGA TCC GCG GCC GCT CGC GA	Klonierung einer multiplen Klonierungsstelle in pRK5-SV40PUR
pRK5MCS2	AGC TTC GCG AGC GGC CGC GGA TCC GGG CCC GAT ATC TCG AG	Klonierung einer multiplen Klonierungsstelle in pRK5-SV40PUR
NtermFLAG GR	CG TCTA GAA A CCA CCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGA TGG ACT CCA AAG	Start Primer eines GRs fusioniert N- Terminal mit einem FLAG-Tag, XbaI-Schnittstelle
PpuMIGR	TTT ACC TG G GGA CC C AGA AGA AAA	Klonierungsoligo für GR, der N-terminal mit FLAG fusioniert ist, PpuMI-Schnittstelle
GFPGR-upstr	ATG CTC GAG CTA TGG ACT CCA AAG AAT CA	Start Primer für GR für Klonierung in den pEGFP-C1 Vektor, XhoI-Schnittstelle
GFPGR- down	ATC GGT ACC TCA CTT TTG ATG AAA CAG A	Stop Primer für GR für Klonierung in den pEGFP-C1 Vektor, KpnI-Schnittstelle
PfIMIGR515	TTG CCA AGA CTT GGT TCAA GGA TTT TCA GAG GTT TC	Stop Primer für GFP-GR1-515 mit PfIMI- Schnittstelle und Stop-Codon

2.9 Geräte

Allegra 21 Zentrifuge	Beckman, Krefeld
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Mannheim
Bodenzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Mannheim
Feinwaage Voyager 50228	Ohaus, Giessen
Fluoreszenz Mikroskop	Olympus, Hamburg
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Jena
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad, München
Gene Pulser II	Bio-Rad, München
horizontaler Gelträger Agarosegele	Bio-Rad, München
Imaging System 440	Kodak, USA
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Mannheim
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Microplattenreader MR 7000	Dynatech, Denkendorf

Mikroskop CK30	Olympus, Hamburg
Omifuge 2.0 RS	Heraeus, Mannheim
PCR-Maschine DNA Engine PTC-200	Biozym, Oldendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Power-Pac 200	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage PureLab ultra	Labtech, Wohlen
Rotamix Überkopf-Schüttler	ELMI, Latvia
Schüttler Vibrax	IKA Labortechnik, Staufen
Shaker S4	ELMI, Latvia
Spektrophotometer DU 640	Beckman, Krefeld
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Mannheim
UV-Transilluminator	Stratagene; Amsterdam
Viktor2 Multilabel Counter	Wallac, Finnland
Vortexer MS2	IKA Labortechnik, Staufen
Waage Voyager 50187	Ohaus, Giessen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge J2 MC Rotor JA-14	Beckman, Krefeld

2.10 Kits

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
ECL-Detektionssystem	Amersham (Freiburg)
Hyperfilm	Amersham (Freiburg)
Ni-NTA® -Matrix	Qiagen (Hilden)
Nuceobond AX 2000 Kit	Macherey-Nagel (Düren)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
M2-FLAG beads	Sigma

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

Es wurden kompetente Bakterien der Stämme Escherichia coli (E.coli) DH5 α , GT116 und BL(DE3)pLysS verwendet. Die Bakterien wurden einmal kommerziell erworben (siehe Kapitel 2.5) und anschließend selbst weitergezogen sowie kompetent gemacht.

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Puffer:

TFB1: 100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH5,8 steril filtrieren

TFB2: 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH6,8 mit KOH, steril filtrieren

TB-Medium: 12g Trypton, 24g Hefe Extrakt, 4ml Glycerin in 900ml H₂O lösen und autoklavieren

2,3g KH₂PO₄, 12,5g K₂HPO₄ in 100ml H₂O lösen und autoklavieren
kurz vor Gebrauch beide Lösungen mischen

Um E.coli zur Aufnahme von DNA zu befähigen, wurden 10ml Kultur des entsprechenden E.coli-Stammes in TB-Medium ohne Antibiotikum bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 150ml TB-Medium überführt und so lange weiter inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 vorlag (sollte nicht überschritten werden). Alle folgenden Schritte wurden mit vorgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde auf Zentrifugengefäße verteilt und 5min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation für 10min bei 4500rpm und 4°C (Beckman, Zentrifuge J2 MC, Rotor JA-14) wurden die sedimentierten Bakterien in 45ml TFB1-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension 90min auf Eis inkubiert, anschließend wie oben zentrifugiert und das Pellet in 6ml TFB2 aufgenommen. Nach dem Aliquotieren á 200 μ l wurden die Bakterien sofort in einem Trockeneis-Ethanol-Bad eingefroren und konnten bei -80°C gelagert werden.

3.1.2 Kultur von Escherichia coli

Medium:**TB-Medium:** siehe 3.1.1**Antibiotika:** Ampicillin Endkonzentration: 100µg/ml
Kanamycin Endkonzentration: 50µg/ml
Zeocin Endkonzentration: 25µg/ml

Der gewünschte Bakterienstamm wurde von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder direkt aus der Glycerinkultur in einem Liter sterilem TB-Medium, welches mit dem Selektionsantibiotikum versetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 1ml der Übernachtskultur bei 3500rpm 4min abzentrifugiert (Beckman, Zentrifuge J2 MC Rotor JA-14) und in 500µl Glycerinpuffer (TB-Medium + 50%Glycerin) resuspendiert. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C langfristig gelagert.

3.1.3 Transformation

LB-Agarplatten: 20g LB Broth-Base, 15g Agar-Agar in 1 Liter ddH₂O; autoklavieren
mit Antibiotikum versetzen und in 10cm-Platten gießen

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 10-50ng Plasmid-DNA bzw. 10µl Ligationsansatz zu je 200µl Zellen dazupipettiert, gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45sek. Nach 2min auf Eis, wurde jeder Transformationsansatz mit 800µl SOC-Medium versetzt, 1Stunde bei 37°C im Thermoschüttler oder im Wasserbad inkubiert und verschiedene Mengen (50µl, 250µl und 800µl) auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten Einzelkolonien zur genaueren Untersuchung gepickt werden.

3.2 DNA-Präparation und Reinigung

3.2.1 Minipräparation mit E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit

Puffer: vgl. Herstellerhandbuch

Bei dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (Pepqlab, Erlangen) handelt es sich um eine Methode, die Zentrifugationssäulen mit Silicamembranen verwendet, welche selektiv und reversibel

DNA binden. Für eine DNA-Präparation wurden Einzelkolonien von LB-Agar-Platten in 8ml TB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1ml der Übernachtskultur für die Herstellung einer Glycerinkultur abgenommen (siehe Kapitel 3.1.2) und der Rest für die Isolierung der Plasmid-DNA verwendet. Nach Zentrifugation (3500rpm; 10min Beckman, Zentrifuge J2 MC Rotor JA-14) erfolgte eine alkalische Lyse der Bakterien. Dazu wurde das Bakterienpellet in 250µl der Lösung I resuspendiert und der Ansatz in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250µl der Lösung II wurde einige Male invertiert und für maximal 5min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Durch Zugabe von Lösung III (350µl) wurde die Lyse gestoppt und der Ansatz 10min bei 13000rpm (Heraeus, Tischzentrifuge Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine HiBind-Miniprep-Säule, die auf einem 2ml Sammeltube steckte, gegeben und bei 13000rpm für 1min (Heraeus, Tischzentrifuge Biofuge pico) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die an die Silicamembran gebundene DNA mit 750µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule bei 13000rpm für 1min (Heraeus, Tischzentrifuge) getrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 50µl destilliertem Wasser mittels Zentrifugation in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert und wurde für weitere Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Puffer:

S1: 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH8,0 RNase zufügen 100µg/ml, kühl lagern

S2: 200mM NaOH, 1% SDS

S3: 2,8M Kaliumacetat mit Essigsäure pH5,1 einstellen

N2: 100mM Tris, 900mM KCl, 15% EtOH, mit H₃PO₄ auf pH6,3

N3: 100mM Tris, 1150mM KCl, 15% EtOH, mit H₃PO₄ auf pH6,3

N5: 100mM Tris, 1000mM KCl, 15% EtOH, mit H₃PO₄ auf pH8,5

TE-Puffer: 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH7,5

Für die Herstellung großer DNA-Mengen mit hoher Reinheit wurde der Nuceobond AX Kit der Firma Macherey-Nagel gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Bakterien aus einer Übernachtskultur (ca. ein Liter TB-Medium + Antibiotikum) wurden durch 15 minütige Zentrifugation (3500rpm, 4°C, Beckman-Zentrifuge) pelletiert und in 25ml S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 25ml S2-Puffer wurde durch Invertieren vorsichtig gemischt und zur Lyse der Bakterien 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 25ml S3-Puffer zugegeben, mehrmals geschwenkt und der Ansatz 5min auf Eis belassen. Dann wurde für 1 Stunde bei 13500rpm zentrifugiert (Beckman, Zentrifuge J2 MC

Rotor JA-14). Der Überstand wurde über einen Filter auf eine Nucleobond AX2000-Säule gegeben, die zuvor mit 22ml N2-Puffer äquilibriert worden war. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 70ml N3-Puffer gewaschen und schließlich mit 22ml N5-Puffer in ein 50ml-Falcontube eluiert. Nach Fällung des Plasmids mit 16ml Isopropanol wurde für eine weitere Stunde bei 5000rpm zentrifugiert (Bodenzentrifuge), die präzipitierte DNA mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 500-1000µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration bestimmt.

3.2.3 Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinen wurden DNA-Lösungen von einem Minimalvolumen von 100µl mit einem Volumen Phenol (Phenol, mit TE-Puffer, pH7,0 äquilibriert und mit 0,1% 8-Hydroxychinolin versetzt) gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde mit einem Volumen Chloroform (Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1) versetzt und kräftig geschüttelt (Vortexer). Um eine schnellere Phasentrennung zu erreichen wurde 3min bei 13000rpm (Heraeus, Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und die oben beschriebene Prozedur wiederholt. Anschließend wurde eine Ethanolfällung durchgeführt.

3.2.4 Ethanolfällung

Puffer:

Natriumacetat: 3M Natriumacetat, pH3,5

lin. PAA: Herstellung nach (Gaillard und Strauss, 1990)

Zur Aufreinigung nach der Phenolextraktion, Beendigung enzymatischer Reaktionen oder zur Konzentrierung von DNA wurden Ethanol-Fällungen durchgeführt. Die DNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat versetzt, gemischt, mit 2,5 fachen Volumen Ethanol versetzt, wiederum gemischt und für 1 Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. DNA-Lösungen mit einer geringen Konzentration wurden vor der Fällung mit 10-20µg linearem Polyacrylamid (lin. PAA) als Carrier versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000rpm/ 4°C (Heraeus, Kühlzentrifuge) pelletiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in TE-Puffer gelöst und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

DNA-Lösungen weisen bei einer Wellenlänge von 260nm eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion auf, die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der Konzentration

proportional ist.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Lambert-Beersche Gesetz})$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke in cm

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch (Spektralphotometer, Beckman) durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm in einer Quarz-Küvette (Schichtdicke = 1cm) bestimmt. Die zu messende Lösung wurde so verdünnt, daß man sich im linearen Meßbereich zwischen 0,1 und 1,0 befand.

Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt dabei Informationen zu möglichen Proteinkontaminationen und sollte im optimalen Fall zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Kontrolle wurde aber auch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde eine bestimmte DNA-Menge auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen und die Intensität der Bande mit der eines Standards bekannter Menge verglichen.

3.3 Präparation von DNA-Fragmenten

3.3.1 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben der Hersteller im empfohlenen Restriktionspuffer. Für die Spaltung wurden 2-10µg Plasmid oder ein gefälltes PCR-Produkt eingesetzt und mit 2-5 Einheiten Enzym in einem Endvolumen von 50-100µl für 2h bei 37°C inkubiert. Wurde mit mehreren Enzymen geschnitten, deren Pufferbedingungen nicht übereinstimmten, wurde erst mit dem Enzym geschnitten, dessen Puffer den niedrigeren Salzgehalt aufwies, anschließend das Enzym bei 65°C denaturiert und danach die Pufferbedingungen für das nächste Enzym angeglichen. War das nicht möglich, so wurde die DNA nach der ersten Spaltung gefällt. Die Spaltung wurde anschließend auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

3.3.2 Gelelektrophorese

Puffer:

10x TBE: 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA, 90mM Tris-HCl pH8,3

DNA-Auftragspuffer: 5% Glycerin; 0,5% SDS; 10mM EDTA; 0,025%

Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol

Zur Kontrolle von Plasmiden, zur Analyse von Restriktionsspaltungen oder PCR-Reaktionen wurde Agarose in einer Konzentration von 1-2% in 1x TBE-Puffer suspendiert und durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Die Gellösung wurde in einen horizontalen Gelträger (Bio-Rad), der mit einem Kamm versehen war, gegossen und erstarren lassen. In dieser Zeit wurden die zu trennenden DNA-Proben mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und der λ -Marker 4min bei 65°C ersetzt. Das Gel wurde in eine mit 1x TBE-Puffer und 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid (Stocklösung: 10mg/ml) gefüllte Gelapparatur überführt und die Proben in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100-200V für 30-60min und anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (Stratagene, Amsterdam) analysiert bzw. fotografiert.

3.3.3 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden

Linearisierte Klonierungsvektoren wurden vor der Ligation mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt, um mögliche Religationen des Vektors zu unterbinden. Dieses Enzym katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphats von DNA und kann im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm vollständig und irreversibel hitzeinaktiviert werden. Das linearisierte 5'-terminal-phosphorylierte DNA-Fragment wurde mit 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungs-Puffer gemischt. Handelte es sich um ein 5'-überhängendes Fragment wurde pro pMol DNA eine Einheit SAP zugesetzt und 10min bei 37°C inkubiert. Bei "blunt"-5'-Enden wurden 5 Einheiten SAP verwendet und 40min inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15min bei 65°C inaktiviert und die Lösung konnte direkt für die Ligation verwendet werden.

3.3.4 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Um Oligonukleotide ligierbar zu machen oder zur radioaktiven Markierung von DNA wurde T4 Polynucleotid-Kinase, 3'-phosphatasefrei (PNK) verwendet. Dieses Enzym katalysiert den Transfer der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe der DNA und besitzt keine 3'-Phosphataseaktivität. Hierzu wurden 20pMol 5'-OH-Enden mit 20pMol ATP oder γ -³²P ATP mit Phosphorylierungspuffer in einem Endvolumen von 50 μ l gemischt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 30min inkubiert und durch rasches Abkühlen auf Eis gestoppt.

3.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels der PCR-Methode können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Hierfür benötigt man zwei Oligonucleotide, die die gewünschte Sequenz flankieren und spezifisch an die DNA binden. Die Amplifikation erfolgte mit einer thermostabilen Pwo-Polymerase, wenn das Fragment anschließend für eine Klonierung verwendet wurde. Diese Polymerase ist eine hochspezifische 5'→3'-DNA-Polymerase mit einer zusätzlichen 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (proofreading), so daß sie sich durch eine 10x niedrigere Fehlerrate als die Taq-Polymerase auszeichnet. Die Taq-Polymerase wurde für PCRs verwendet, bei denen das Amplifikationsprodukt nicht unbedingt fehlerfrei sein mußte. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema in einem Gesamtvolumen von 50µl durchgeführt:

5µl	10x Reaktionspuffer mit MgSO ₄
10pmol	1.Primer
10pmol	2.Primer
200µM	dNTPs
10-50ng	DNA-Templat
2,5U	Pwo-Polymerase

Nach Zugabe der Polymerase wurde umgehend die PCR nach folgendem Zyklusprofil durchgeführt:

Denaturierung	30sek	94°C
Annealing	30sek	40-65°C je nach Primerbeschaffenheit
Elongation	30-90sek	72°C
	30Zyklen	

Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab, während die Annealingtemperatur durch die verwendeten Primer variiert (Faustregel: pro annealende Base des Primers 2°C für A/T + 4°C für G/C). Je nach Problemstellung konnte dieses Grundprotokoll bezüglich Hybridisierungstemperatur, Hybridisierungsdauer, Elongationszeit und Zyklenzahl angepaßt werden.

3.3.6 Abbau von 3'-überhängenden Enden

Um bei DNA-Fragmenten das 3'-überhängende Ende abzubauen, wurde nach der Restriktionsspaltung eine Behandlung mit Pwo-Polymerase durchgeführt. Hierzu wurde das gefällte Fragment in einem 50µl Ansatz wie für eine PCR mit Pwo-Polymerase und allen

dazu nötigen Lösungen außer den Primern versetzt und 10min bei 72°C inkubiert. Dadurch entsteht ein gattes 3'-Ende. Das DNA-Fragment wurde anschließend mit Ethanol gefällt.

3.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der Gelelektrophorese konnte die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Es wurde dabei darauf geachtet, daß die Bestrahlungszeit so kurz wie möglich war, um UV-Schäden der DNA zu vermeiden. Das Gelstück wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA wurde mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" von Qiagen durchgeführt. Hierzu wurde das Gelstückchen gewogen und 300µl QG-Puffer mit pH-Indikator pro 100mg Gel hinzugegeben. Anschließend wurde die Agarose 10min bei 50°C geschmolzen. War das zu isolierende DNA-Fragment kleiner als 500 bzw. größer als 4000 Basenpaare wurde pro 100mg Gel 100µl Isopropanol gegeben und die Lösung anschließend in QIAquick-Säulen pipittiert. Die Säule wurde auf ein 2ml-Sammeltube gesetzt, zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Dann wurde mit QG-Puffer und PE-Puffer mittels Zentrifugation gewaschen. Die Säule wurde durch Zentrifugation getrocknet und auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Die an die Silica-Membran gebundene DNA konnte mit 50µl destilliertem Wasser eluiert werden. Nähere Angaben zu Pufferlösungen und Durchführungen sind dem Handbuch des "QIAquick Gel Extraction Kit" zu entnehmen.

3.3.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation eines Vektors mit einem Insert wird durch die T4-DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH- mit einer 5'-Phosphatgruppe kovalent unter Ausbildung einer Phosphatdiesterbindung verknüpft. Das Verhältnis von Vektor und Insert war 1:1, wenn es sich um eine Reaktion mit überhängenden Enden handelte oder 1:2 bei Ligationen mit einem überhängenden und einem glatten Ende. Die zu ligierenden Fragmente wurden mit 10 Einheiten T4-Ligase und Ligationspuffer in einem Volumen von 20µl gemischt. Die Reaktion wurde 16h bei 16°C und anschließend 4h bei 4°C inkubiert.

3.4 Klonierungen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien angewendet. Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2.7.1 aufgeführt. In den meisten Fällen wurden die Vektoren so präpariert, daß sie ein

überhängendes und ein glattes Ende besaßen. Die jeweiligen Inserts wurden mittels PCR amplifiziert und ein überhängendes Ende durch Restriktionsverdau eingeführt. Zur Einführung von Mutationen in die Mitte eines Gens oder zur Herstellung von Chimären wurde folgende Strategie verfolgt (Abb. 6): Es wurden zuerst zwei verschiedene PCRs durchgeführt, eine mit dem jeweiligen Startprimer und dem 3'-Primer, der die Mutation trug, und die andere mit dem 5'-Primer, der ebenso die Mutation trug und dem jeweiligen Endprimer des Gens. Anschließend wurden beide PCR-Produkte aus einem Agarosegel isoliert und es konnte nun eine dritte PCR mit beiden PCR-Produkten der ersten Runde und jeweils dem Start- und End-Primer durchgeführt werden. Das so entstehende PCR-Produkt trug nun die entsprechende Mutation und konnte nach Restriktionsverdau ligiert werden. Wurde der Vektor am 5'-Ende dephosphoryliert, so wurden die für die PCR verwendeten Primer vor der Reaktion phosphoryliert, um eine Ligation zu ermöglichen. Die jeweils verwendeten Primer sind in Tabelle 2.8 und alle verwendeten Expressionsplasmide in den Tabellen des Abschnitts 2.7 aufgeführt, jeweils mit genauer Klonierungsstrategie. Alle hergestellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung bei der Firma Medigenomix (früher Toplab) verifiziert.

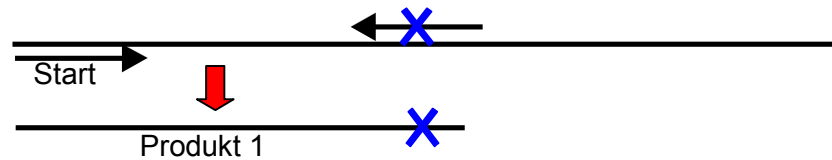
3.5 Blau-Weiß-Selektion

LB-Agarplatten: 20g LB Broth-Base; 15g Agar-Agar in 1 Liter ddH₂O; 5mM IPTG;
80µg/ml X-Gal; 25µg/ml Zeocin

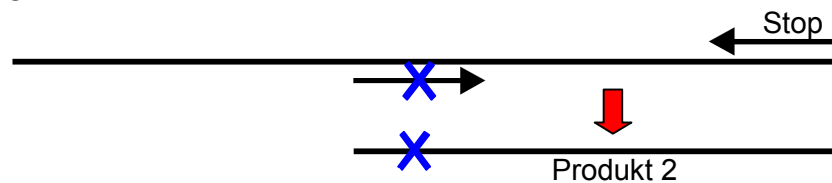
Eine Blau-Weiß-Selektion konnte bei der psiRNA-Klonierung angewendet werden. Bakterien, welche den zur Blau-Weiß-Selektion fähigen Vektor psiRNA enthalten, sind zeocinresistent, da der Vektor ein *zeo^R*-Gen enthält, und besitzen überdies eine funktionsfähige β -Galaktosidase. Durch den enzymatischen Umsatz von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol können Bakterien mit funktionstüchtiger β -Galaktosidase leicht identifiziert werden. Ihre Kolonien erscheinen durch den gebildeten Farbstoff blau. Der Einbau eines Fragmentes in die MCS (multiple cloning site, liegt innerhalb eines 5'-Abschnitts des *lac Z*-Gens) zerstört das Leseraster des *lac Z*-Gens. Es kann keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden, so daß die betreffenden Bakterien-Kolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. Das IPTG (Isopropyl-Thiogalaktopyranosid) dient als Induktor für die β -Galaktosidase, wird jedoch nicht durch die β -Galaktosidase zersetzt.

Ausgangsprodukt:Strategie:

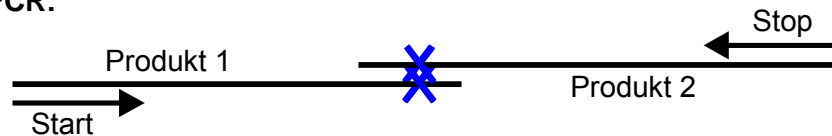
1.PCR:



2.PCR:



3.PCR:



Ziel: cDNA mit Mutation in der Mitte des Gens



Abb.6: Verwendete Klonierungsstrategie zum Einbringen von Mutationen oder Herstellung von Chimären.

Das X markiert die Stelle der gewünschte Mutation. Zur Herstellung von Chimären wurden die Primer so gewählt, daß sie zu beiden im Chimär enthaltenen cDNAs komplementär waren. Die 3.PCR erfolgt mit den jeweiligen Start- und Stop-Primern des Gens, sowie den beiden Produkten der ersten beiden PCRs

Dies bedeutet, daß auf den benutzten Nährböden nur diejenigen Bakterien Kolonien bilden können, welche auch durch die Transformation ein zeo^R -Gen erhielten. Sind die Zellkolonien durch X-Gal blau gefärbt, ist die β -Galaktosidase noch funktionsfähig, d.h. es wurde bei der Ligation keine Fremd-DNA in den Vektor eingebaut. Nur weiße Kolonien müssen weiter untersucht werden.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Herstellung verschiedener Lösungen für die Zellkultur

3.6.1.1 Aktivkohle-DextranT70 Mischung

50g Aktivkohle wurden mit 500ml 10mM Tris-HCl pH7,8 versetzt und 10min langsam gerührt. Anschließend wurde die Lösung stehen gelassen, damit sich die Kohle absetzt. Der Überstand wurde verworfen und der gesamte Vorgang wurde wiederholt. Nun wurde zur Kohle 5g Dextran T70 und 400ml 10mM Tris-HCl pH8,0 zugegeben und die Lösung wurde autoklaviert. Diese Mischung konnte bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert werden.

3.6.1.2 Steroid-freies FBS

500ml FBS (Invitrogen) wurden aufgetaut und für eine halbe Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert. Das FBS wurde mit 25g AG1-X8 Resin versetzt und über Nacht langsam bei 4°C gerührt. Am nächsten Tag wurde das FBS dekantiert und mit 10ml Aktivkohle-Dextran Mischung versetzt. Es wurde wieder wie am Vortag über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (Beckman, 10min, 1000rpm) und durch einen Faltenfilter vorgereinigt. Zum Schluß konnte steril filtiert werden. Das sterile, steroidfreie FBS wurde à 50ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.6.1.3 Trypsin

Es wurden 800ml endotoxinfreies Wasser mit 100ml EBSS und 100ml Trypsin-EDTA gemischt und die Mischung wurde steril filtiert. Das Trypsin wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.6.2 Vermehrung, Lagerung und Inkulturnahme

Einfriermedium: DMEM mit 10% DMSO und 40% FBS

Alle verwendeten Zelllinien (vergleiche Kapitel 2.6.1) wurden als adhärente Zellen in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% FBS, 1% Antibiotikum und 1% Pyruvat. HeLa-Zellen, die für Immunfluoreszenzbestimmungen (vergl. Kapitel 3.7.3)

verwendet wurden, wurden in Phenolrot-freiem DMEM mit 10% FBS, 1% Antibiotikum und 1% Pyruvat kultiviert. Alle Zellen wurden in einem 37°C-CO₂-Brutschrank (Heraeus) mit 5% CO₂ kultiviert. Wurde ein dichter Zellrasen erreicht, mußten die Zellen ausgedünnt werden. Das Ausdünnen der Zellen variierte je nach Zelltyp von 1:2 (SK-N-MC) bis 1:10 (HEK293). Zum Ausdünnen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3ml Trypsin/75cm²-Flasche versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 3ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einem sterilen Falcontube bei 1200rpm 4min zentrifugiert (Beckman, Allegra 21). Das Zellpellet wurde je nach Verdünnungsfaktor in frischem Medium suspendiert und in neue Flächen mit vorgelegtem Medium verteilt.

Zum Einfrieren wurde das Zellpellet einer konfluenten Flasche in 1ml Einfriermedium suspendiert und in ein Cryoröhrchen überführt. Der Einfrierprozeß sollte sehr langsam vor sich gehen, um spätere Schäden durch starke Kristallbildung zu vermeiden. Die Cryoröhrchen wurden deshalb erst bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Auf diese Art und Weise können Zellen dauerhaft gelagert werden.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, mußte das im Einfriermedium enthaltene DMSO, welches zytotoxisch wirkt, entfernt werden. Dazu wurden die Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Becherglas mit 37°C warmem Wasser so schnell wie möglich aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in ein Falcontube mit vorgelegtem Medium überführt und 4min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine 75cm²-Kulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt oder die Zellen bei Bedarf passagiert.

3.6.3 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind prokaryotische Mikroorganismen ohne Zellwand und stellen eine der häufigsten Kontaminationen von Zellkulturen dar. Da Mycoplasmen den Stoffwechsel, die Morphologie und die Proliferation von Zellen beeinflussen und damit die Ergebnisse von Experimenten verändern können, ist eine regelmäßige Kontrolle der Zellen nötig.

Der Nachweis erfolgte nach Anfärben der Doppelstrang-DNA mit einem dafür geeigneten Farbstoff und anschließender Untersuchung der Fluoreszenz. Die Zellen wurden dafür auf 100mm Kulturplatten bis zu einer Dichte von 60-80% herangezogen und das Medium abgesaugt. In einem Falcontube wurde der Farbstoff Bisbenzimid mit Methanol zu einer Konzentration von 1µg/ml verdünnt und die Zellen mit 5ml dieses Gemisches gewaschen, um Restmedium zu entfernen. Nach Absaugen des Überstands wurden erneut 5ml des

Reagenzes zugegeben und 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff abgesaugt und das Methanol verdunstet. Die Fluoreszenz konnte nun mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus) mit Inversionsobjektiv sichtbar gemacht werden. Eine mit Mycoplasmen infizierte Kultur erkennt man daran, daß neben der klar abgegrenzten Kernfluoreszenz der Zellen auch das Zytoplasma bzw. äußere Bereiche gefärbt sind. Die Kontamination ist meist als gesprenkelte, überall verteilte Fluoreszenz zu erkennen.

3.7 Transfektionen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet verschiedene Methoden zum Einschleusen von DNA.

3.7.1 Kationisches, polymerisches Transfektionsreagenz

Das kationische Polymer "ExGen 500" (Fermentas) ist ein lineares Polyethylenimin-Derivat mit einem molekularen Gewicht von 22kDa und erlaubt das nicht-virale, nicht-liposomale Einschleusen von Fremd-DNA in eine Vielzahl von Zelllinien. Das Polymer hat eine hohe kationische Ladungsdichte und bildet mit der DNA durch ionische Wechselwirkungen Partikel mit einem Durchmesser von 50nm. Diese Komplexe lagern sich an der Zelloberfläche an und werden durch Endozytose aufgenommen. Da jedes dritte Atom des ExGen 500-Rückgrats ein protonierbarer Aminostickstoff ist, kann der Komplex den niederen pH-Wert der Endosomen puffern und erleichtert dadurch den Bruch der Endozytosevesikeln. Die Abgabe des ExGen 500/DNA-Komplexes ins Zytoplasma findet somit vor einem lysosomalen Abbau der DNA statt. Dadurch wird eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Toxizität von ExGen 500 erreicht. Leider ist das Reagenz sehr teuer, so daß diese Methode nur für Transfektionen verwendet wurde, bei denen es wichtig war, die Morphologie der Zellen so weit wie möglich zu erhalten und eine hohe Effizienz bei geringer Zellzahl notwendig war, wie z.B. bei der Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 3.7.3). Es wurden pro 6-well Platte insgesamt 1µg Plasmid transfiziert. Dabei wurde versucht, das im Luciferase-Assay verwendete Verhältnis von GR und Cofaktor beizubehalten. Die Plasmide wurden mit 150mM Natriumchlorid-Lösung auf 100µl aufgefüllt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurde das ExGen Reagenz 1:5 mit 150mM Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Pro Well werden 100µl benötigt. Anschließend wurde das verdünnte ExGen zur DNA-Lösung pipettiert und gemischt. Nach 10min wurde 2ml Steroid- und Phenolrot-freies Medium dazugegeben und dieses Gemisch auf die Zellen getan. Um die Effizienz zu erhöhen wurden die 6-Well Platten für 5min bei 280rpm zentrifugiert (Heraeus, Omifuge2.0 RS). Die Zellen wurden über Nacht

inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und gegebenenfalls mit Hormon stimuliert.

3.7.2 CaPO₄-Methode

Puffer:

2xHBS: 274mM NaCl, 10mM KCl, 1,4mM Na₂PO₄·xH₂O, 12mM Dextrose, 40mM HEPES mit 1M NaOH pH 7,1, steril filtrieren

15% Glycerin: 150ml Glycerin mit PBS auf 1l auffüllen, steril filtrieren

Für die CaPO₄-Methode wurden HeLa oder Sk-N-MC Zellen auf 60mm Kulturplatten kultiviert bis sie eine Dichte von 80% erreicht hatten. Zuerst wurde ein Präzipitat hergestellt: In einem 15ml-Röhrchen mit vorgelegtem, autoklaviertem Wasser wurden 4µg DNA und 100 µl 2xHBS-Puffer gegeben (Endvolumen 200µl) und gemischt. Anschließend wurden 10µl 2,5M CaCl₂ tropfenweise zugegeben und der Ansatz zur Ausbildung des Präzipitats 30min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Währenddessen wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt und das Präzipitat tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde dann einige Male geschwenkt und mindestens 5Std bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2ml 15% Glycerin in PBS für 2min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit frischem, steroidfreiem Medium dem Cortisol zugesetzt wurde für 16Std inkubiert. Leider hat die CaPO₄-Methode eine im Vergleich zur Elektroporation und ExGen-Methode geringe Effizienz, so daß normalerweise die Zellen mittels Elektroporation transfiziert wurden.

3.7.3 Elektroporation

Puffer:

Magnesiumsulfat-Puffer: 1M MgSO₄, pH6,7 mit 0,01N NaOH, autoklavieren

Elektroporationspuffer: 50mM K₂HPO₄, 20mM K-Acetat, pH7,35 mit Essigsäure einstellen und steril filtrieren

Bei der Elektroporation nutzt man den Effekt, daß elektrische Impulse die Durchlässigkeit von Biomembranen erhöhen können ohne die Membranstruktur nachhaltig zu zerstören. Durch die reversiblen kleinen Löcher können Partikel wie DNA ins Zytoplasma gelangen. Je nach Experiment wurden Sk-N-MC, COS-1, MCF-7 oder HEK293 Zellen auf 12-24 100mm Kulturschalen in steroidfreiem Medium zwei Tage vor der Transfektion ausgesät. Für die Elektroporation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die

enzymatische Reaktion wurde mit steroidfreiem Medium gestoppt und die Zellen in ein Falcon-Tube überführt. Nach dem Abzentrifugieren (1200rpm, 4min) wurde das Zellpellet in 390µl Elektroporationspuffer mit 10µl Magnesiumsulfat-Puffer pro Platte (entspricht ca. $\sim 10^7$ Zellen pro Bedingung) resuspendiert. Plasmide, die für alle Platten konstant waren, wurden diesem Gemisch zugegeben. In Vorexperimenten wurden 0,75µg eines GR-exprimierenden Plasmids (pRK7-GR), 1,5µg eines steroidinduzierbaren Reporters (MTV-Luc) und 3µg eines Kontrollplasmids, welches für die β -Galaktosidase kodiert (pCMV- β Gal), als optimale Mengen und Verhältnisse ermittelt. Zur Bestimmung des Androgenrezeptor (AR) und des Progesteronrezeptor (PR) wurden 1µg statt 0,75µg Rezeptorplasmids eingesetzt. Zur Messung der Aktivität des Estrogenrezeptors (ER) wurden MCF-7 Zellen mit 3µg des Estrogen-responsiven Reporters ERE-Luc und 3µg pCMV- β Gal transfiziert. Hitze-Schock-Faktor1 (HSF-1)-vermittelte Transaktivierung wurde mit Hilfe eines von HSF-1 abhängigen Reporters (HSE-Luc) untersucht. Es wurden 3µg HSE-Luc und 3µg pCMV- β -Gal transfiziert. Das Resuspendat wurde je nach Experiment-Aufbau noch aliquotiert und mit Cofaktoren-Plasmid-DNA (Mengen siehe Abbildungen) versetzt. Es wurde darauf geachtet, daß in allen Bedingungen die Gesamtplasmidmenge konstant war, gegebenenfalls wurde mit Klonierungsvektor der Cofaktoren aufgefüllt. Anschließend wurde 400µl in Elektroporationsküvetten pipettiert und elektroporiert (Gene Pulser II). Die optimalen Elektroporationsbedingungen wurden im Vorfeld für jede Zelllinie ermittelt (Sk-N-MC: 300V; 600µF, Cos-1: 350V; 750µF, HEK293: 350V; 750µF, MCF-7: 350V; 750µF). Nach der Elektroporation wurden je 160µl der Zellsuspension in 60mm Kulturschalen eingesetzt, die vor der Elektroporation mit steroidfreiem Medium sowie Hormon vorbereitet wurden. Die Zellen wurden für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.8 Messung der CR Aktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Zur Messung der Aktivität von Steroidrezeptoren kann man sich ihre Fähigkeit als Transkriptionsfaktoren zu wirken, zunutze machen. In einem Reporter-Gen-Assay verwendet man sogenannte Reportergene, z.B. Luciferase, deren Expression von Promotoren kontrolliert wird, die artifizelle oder natürliche Bindungsstellen des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors aufweisen. Ist der Rezeptor in der Lage, an die spezifische Bindungssequenz zu binden, wird die Transkriptionsrate der Luciferase beeinflusst, deren Aktivität leicht zu messen ist. Die Firefly-Luciferase stellt einen sensitiven Reporter zur Quantifizierung der Promotor-Aktivität dar. Sie katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht. Unter Substratsättigung ist die Enzymaktivität von der gebildeten Enzymmenge abhängig und somit proportional zur Aktivität des Transkriptionsfaktors.

3.8.1 Luciferase-Assay

Puffer:

Luciferase-Lysispuffer: 1mM DTT, 0,1M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH7,8

ATP: 0,1M ATP in H_2O pH7,0 mit 1N NaOH

0,5 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH7,8: ca. 400ml 0,5M K_2HPO_4 mit 0,5M KH_2PO_4 auf pH7,8

Luciferin: 10mg Luciferin in 1ml Methanol, 400 μ l 0,5 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH7,8 und
1,6ml H_2O

ATP und Luciferin ansetzen für n Proben + 8 Proben als Vorlauf:

0,5M $KHPO_4$, pH 7.8	10 μ l (x n+8)
0,1M ATP	2,5 μ l (x n+8)
0,1M $MgCl_2$	5 μ l (x n+8)
10mM Luciferin	2 μ l (x n+8)
<u>H_2O</u>	<u>130,5 μl (x n+8)</u>
	150 μl (x n+8)

Vor der Messung der Luciferase wurden die Zellen in der Regel 16 Stunden mit Hormon stimuliert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 500 μ l Luciferase-Lysispuffer abgeschabt und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden die Tubes für 3min in ein Ethanol-Trockeneisbad gestellt und danach 3min in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und die Proben nach Beendigung der Lyse in einer Tischzentrifuge (4min; 13000rpm; RT) abzentrifugiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte in einem Luminometer Victor2 von Wallac. Dazu wurden je 50 μ l des klaren Lysats in eine 96-well Platte pipettiert. Die ersten 8 Wells wurden frei gelassen, um das Pipettiersystem des Geräts erst mit Substratlösung zu füllen und gegebenenfalls restliches Wasser zu entfernen. Die Emmission von Photonen wurde nach automatischer Injektion von 150 μ l Substrat pro Well für 10 Sekunden gemessen und der Meßwert in RLUs (Relative Light Units) angegeben. Nach Beendigung der Messung wurden die Daten gespeichert und das Injektorsystem 3mal mit destilliertem Wasser gespült. Der Hintergrund des Gerätes ist sehr gering, so daß er bei späteren Auswertungen vernachlässigt wurde.

3.8.2 Galaktosidase-Messung

Puffer:

β-Galactosidase-Puffer: 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, 50mM β-Mercaptoethanol

ONPG: 2mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid in H₂O

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde bei Transfektion des Reportergens ein Kontrollplasmid cotransfiziert, welches nicht von der Aktivität des Rezeptor abhängt. In den meisten Experimenten wurde ein für β-Galaktosidase kodierendes Plasmid mit einem CMV-Promotor verwendet. Die Messung der β-Galaktosidase diente so als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz. Dazu wurden je 50 µl des Zelllysats, welches bereits für die Luciferase Messung verwendet wurde, parallel zur Luciferase-Messung in eine andere 96-well Platte pipettiert, in die bereits 100µl β-Galactosidase-Puffer vorgelegt waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl ONPG gestartet und für 10-30min bei 37°C inkubiert, bis eine Gelbfärbung eingetreten war. Die Extinktion wurde in einem Multiphotometer bei 405nm gemessen.

3.8.3 Auswertung der Daten

Für die Auswertung wurden die gemessenen Luciferasedaten mit der β-Galaktosidase Messung normalisiert. Aus den so erhaltenen Werten wurde nun die Stimulierbarkeit des Rezeptors berechnet, indem die entsprechenden Referenzwerte, d.h. die Werte der Zellkulturen, die statt Hormon nur Lösungsmittel enthielten, auf 1 gesetzt wurden. Die einzelnen Abbildungen zeigen die Gesamtstimulierbarkeit, wobei der Wert des Kontrollvektors auf 100% gesetzt wurde. Allerdings wurden für alle Experimente auch die normalisierten Luciferasedaten verglichen, um einen möglichen Effekt auf den unaktivierten Rezeptor nicht zu verschleiern, d.h. um falsche Aussagen zu vermeiden. Wurde kein Effekt auf den unaktivierten Rezeptor gefunden, so wurde nur die Stimulierbarkeit angegeben. Wurde die Aktivität des ungebundenen Rezeptors, wie beim MR, durch Transfektion eines Cofaktors verändert, so wurden die normalisierten Luciferase-Daten mit auf 100% gesetzten Kontrollvektor-Daten gezeigt.

Für den konstitutiven GR wurde zur Berechnung der Stimulierbarkeit der Wert ohne cotransfiziertem GR auf 1 gesetzt, da in diesem Fall der Rezeptor bereits ohne Hormon die Transkription beeinflusst.

3.8.4 Fluoreszenz-Lokalisierung von Proteinen

Puffer:

1xTBS-T: 150mM NaCl, 0,05% Tween, 10mM Tris-HCl, pH8,0

4% PFA: 100ml 40% Formalinlösung mit 1xPBS auf 1000ml auffüllen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann die Lokalisation von Proteinen in der Zelle sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde dazu das Protein von Interesse mit GFP (green-fluorescence-protein) gekoppelt, so daß nicht mit fluoreszierenden Antikörpern gearbeitet werden mußte. Dazu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte einen Tag mit steroidfreien phenolrotfreiem Medium kultiviert und mit ExGen 500 (vgl. 3.6.1) transfiziert. Nach der Transfektion wurde für die Untersuchung der Lokalisation des Rezeptors mit der jeweils angegebenen Konzentration an Hormon für eine definierte Zeit stimuliert. Die Fixierung erfolgte mit 4% PFA für 20 Minuten. Um den zeitlichen Verlauf der Kernlokalisierung besser untersuchen zu können (time course), wurden die Zellen vor Hormongabe 10min auf Eis inkubiert. Das Kulturmedium wurde abpipettiert und die Zellen vorsichtig mit kaltem Medium bedeckt, dem zuvor Hormon zugegeben wurde. Die Fixierung erfolgte nach definierten Zeitpunkten wie in den jeweiligen Experimenten angegeben. Nach dem Fixieren wurden die Zellen dreimal mit 1xTBS-T gewaschen und unter Zugabe eines Tropfens Einbettmedium mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Die Objektträger sind so für mindestens zwei Wochen bei -20°C lichtdicht verpackt haltbar. Die Fluoreszenz wurde bei 405 nm mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) untersucht.

3.9 RNA interference

Das Einschleusen von Doppelstrang-RNA (ds-RNA), korrespondierend zu spezifischen Gensequenzen, führt in vielen Organismen zur Hemmung der Expression von diesen Targetproteinen. Die Möglichkeit, durch die Injektion von ds-RNA Genfunktionen zu beeinträchtigen, wurde zum ersten Mal für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). RNA interference ist ein post-transkriptioneller Prozess, der durch kleine interferierende RNAs (engl: small interfering RNA = siRNA) ausgelöst wird. Eingeschleuste ds-RNA wird zuerst von einem "DICER" genannten Proteinkomplex mit RNaseIII-Aktivität zu siRNAs geschnitten. Diese siRNAs sind 19-21 Basenpaare lange ds-RNA mit 2 Basen Überhang an 3'Ende, oder 43-50 Basenpaare lange RNA mit einer Haarschleifen-Struktur. Diese instruieren dann den "RNA-induced silencing complex" (RISC) zur sequenzspezifischen Spaltung der Target-RNA. Problematisch ist die kurze Lebensdauer von kleinen synthetischen RNA Fragmenten in den Zellen. Es wurde deshalb ein Vektor von

InvivoGen (San Diego) genutzt, der es ermöglicht siRNA in der Zelle zu produzieren. Das Insert wird hinter einen H1-Promotor, einem RNAIII-Promotor, kloniert und kodiert für eine Sequenz, die eine Haarschleifen-Struktur ausbilden kann. Die Einzelstrang-Region der Schleife wird aus 5-7 Basen gebildet, während der Stamm 19-21 Basen lang und homolog zur RNA ist, die abgebaut werden soll. Genaue Klonierungsanleitungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Positive Klone können leicht über eine Blau-Weiß Selektion (vgl. Abschnitt 3.5) identifiziert werden. Es wurden drei verschiedene Sequenzen in FKBP52, ohne Homologie zu FKBP51, identifiziert und in die BbsI Schnittstelle von psiRNA kloniert. Zur Kontrolle der Spezifität der Sequenzen wurden gleichzeitig drei mutierte Sequenzen kloniert, in denen die mittleren vier Basen umgedreht wurden.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Analyse der Proteine in einer Präparation wurde der BCA-Kit von Pierce verwendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Reaktionsschema kombiniert die Biuret-Reaktion (Protein und Cu^{2+} in alkalischer Lösung führt zur Bildung von Cu^+) mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure, einem sehr spezifischen Nachweisreagenz für Cu^+ . Durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^+ -Ion entsteht ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte in einem Mikroplattenreader (Dynatech). Vor jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Rinderserum-Albumin (Stammlösung 1 mg/ml) aufgenommen, anhand derer der Proteingehalt der eingesetzten Proben bestimmt wurde.

Rekombinante Proteine aus Bakterien wurden zusätzlich über eine UV-Extinktion bestimmt. Die Methode basiert auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Da für die Messung stark verdünnte Lösungen verwendet werden, benötigt man nur wenig Material. Triton X-100 besitzt bei 280 nm eine hohe Eigenextinktion, so daß durch dieses Detergenz solubilisierte Proteine auf diesem Wege nicht bestimmt werden können. Die Störung durch Nukleotide oder Nukleinsäuren kann durch Messung der Extinktion bei 260nm eliminiert werden. Zur Errechnung der Proteinkonzentration wird die Formel von Warburg und Christian verwendet:

$$c(\text{Protein (mg/ml)}) = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$$

3.10.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Puffer:**3x Trenngel-Puffer:** 0,3% SDS, 1125mM Tris-HCl pH8,8**2x Sammelgel-Puffer:** 0,2% SDS, 250mM Tris-HCl pH6,8**5x Laemmli-Auftragspuffer:** 25% Glycerin, 5% SDS, 200mM Tris-HCl, pH6,8
0,025% Bromphenolblau, 1M β -Mercaptoethanol**1x Laemmli-Laufpuffer:** 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,05% SDS

Bei der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Polyacrylamid-Gele unterteilen sich in ein oberes Sammelgel, das etwa 2-3cm einnimmt und ein darunter liegendes Trenngel. Die Ionenverhältnisse der beiden Gele unterscheiden sich, so daß die zu trennenden Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Lauffront konzentriert werden, um anschließend gemeinsam in das höher vernetzte Trenngel eintreten zu können, wo sie nach ihrer Größe getrennt werden. Gele wurden zwischen 2 abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten, die durch 1mm breite „Spacer“ getrennt waren (BioRad) gegossen. Das Trenngel (10-15%, vgl. Tabelle) wurde sofort mit Isopropanol überschichtet, wodurch eine gerade, waagerechte Trenngelkante gewährleistet wurde. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, mit Wasser gespült, getrocknet und das Sammelgel gegossen. Hier wurde zur Bildung der Probenaschen ein Kamm eingeführt. Nach der Polymerisation konnten die Gele in die vorgesehenen vertikale Apparaturen (BioRad) gespannt werden und die Gelkammer wurde mit 1x Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben (10-15 μ g Gesamtprotein) wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und 4min bei 95°C denaturiert. Das im Auftragspuffer enthaltene β -Mercaptoethanol kann Disulfidbrücken reduzieren und die angelagerten SDS-Moleküle sind zum Molekulargewicht der Polypeptide proportional, so daß im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt werden. Pro Gel wurde in einer Spur ein Proteinmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100mA für 60min durchgeführt. Anschließend konnten die Proteine entweder mit Coomassie-Blue gefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert werden.

Trenngel:

Anzahl der Gele	10%			12%			15%		
	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Acrylamid-Bis (ml)	2,5	5	10	3	6	12	3,8	7,5	15
ddH ₂ O (ml)	2,5	5	9,9	2	4	7,9	1,2	2,5	4,9
3xTrenngelpuffer (ml)	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10
APS (µl)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
TEMED (µl)	6,25	12,5	25	6,25	12,5	25	6,25	12,5	25

Sammelgel (4%)

Anzahl der Gele	1	2	4
Acrylamid-Bis (ml)	0,338	0,675	1,35
ddH ₂ O (ml)	0,9	1,8	3,6
2xSammelgelpuffer (ml)	1,25	2,5	5
APS	12,5µl	25µl	50µl
TEMED	2,5µl	5µl	10µl

Tabelle 3.10.2: Pipettierschema für PAGE-Gele**3.10.3 Coomassie-Färbung****Puffer:**

Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie-Brillant Blau R, 45% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärbepuffer: 45% Methanol, 10% Essigsäure

Nach der SDS-PAGE konnten die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue gefärbt werden. Dazu wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel etwa 10min in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die Entfärbelösung wurde in dieser Zeit öfters erneuert. Das Gel konnte schließlich auf 3MM-Papier in einem Geltrockner (Bio-Rad) getrocknet werden.

3.10.4 Immunoblotting

Puffer:**Transferpuffer:** 48mM Tris, 39mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol**1xTBS-T:** 150mM NaCl, 0,05% Tween, 10mM Tris-HCl, pH8,0**Ponceau:** 2% Ponceau S, 30% Trichloressigsäure, 30% Sulfosalicylsäure
kurz vor dem Gebrauch mit dest. H₂O 1:10 verdünnen

Eine immunologische Charakterisierung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wird durch den sogenannten Western-Blot ermöglicht. Dazu müssen die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Membran, meist aus Nitrozellulose (Schleicher und Schuell), überführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Elektrotransfer nach der Semi-Dry Methode durchgeführt. Dabei werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran gezogen. Zur Immundetektion der transferierten Proteine wird die Membran anschließend mit spezifischen Antikörpern inkubiert, die an ein bestimmtes Epitop binden. Mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann diese Bindung durch Chemilumineszenz gut nachgewiesen werden. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese vorsichtig von den Glasplatten gelöst und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden zwei Lagen mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf die Transferapparatur (BioRad) gelegt. Darauf wurden zuerst die in Transferpuffer eingelegte Membran, dann das Gel und zuletzt wieder eine Lage Transferpuffer-getränktes Filterpapier gelegt, so daß ein Sandwich entstand. Es wurde immer darauf geachtet, daß alle Schichten gut durchnäßt waren und sich keine Luftblasen bildeten. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von ca. 7mA pro Gel für ca. 110 Minuten. Die Membran wurde vorsichtig aus der Anordnung entnommen, mit Ponceau gefärbt, um den Transfer zu kontrollieren und anschließend mit 1xTBS-T wieder entfärbt. Unspezifische Bindestellen wurden in 1x TBS-T mit 5% Milchpulver (Blocking-Puffer) bei 4°C über Nacht geblockt. Die Nitrozellulose wurde am nächsten Tag mit in Blocking-Puffer verdünntem Erstantikörper (Verdünnung vgl. 2.4.1) versetzt und wieder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in 1xTBS-T wurde die Membran mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Zweitantikörper (Verdünnung vgl. 2.4.2) für eine Stunde inkubiert. Nach einem abschließenden dreimaligen Waschgang mit 1xTBS-T wurde ECL-Reaktionsreagenz (Amersham Pharmacia) auf der sich in einer Entwicklungskassette befindlichen Nitrozellulosemembran verteilt und mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Nach einer Minute wurde der Überschuß an Reagenzien aus der Folie gestrichen und ein Photofilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia) in einer Dunkelkammer aufgelegt. Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um ein hochempfindliches nicht-radioaktives Verfahren. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein

zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Das Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand gebracht. Die Lichtemission, die beim Absinken des angeregten Luminol in den Grundzustand entsteht, führt nach der Entwicklung zu einer Schwärzung des Röntgenfilms. Hierfür wurde der Film mit Kodak GBX Developer (Sigma) behandelt, ein Mal in Wasser gewaschen und mit Kodak GBX Fixer (Sigma) fixiert. Die Proteinbanden konnten mit dem mitgeführten Proteinmarker abgeglichen werden.

3.10.5 Protein-Protein-Co-Immunpräzipitation

Puffer:

Lysis Puffer A: 130mM NaCl, 20mM Na₂MO₄, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH7,5
10% Glycerol; 0,5% Triton-100

1xTBS: 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH8,0

Ziel dieses Verfahrens ist es, eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen. In vorliegender Arbeit wurden FLAG-gekoppelte Proteine präzipitiert. HEK-Zellen (konfluente 100cm-Platte pro Ansatz) wurden mit dem Plasmid, welches für die FLAG-gekoppelte Variante des zu untersuchenden Proteins kodiert, mittels Elektroporation (vgl. 3.6.3) transfiziert und einen Tag in 100cm-Platten wachsen gelassen. Die Zellen wurden in kaltem PBS abgekratzt und bei 1200rpm 4min (Beckman, Allegra 21) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Lysis Puffer A mit 10µl Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma) resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Überstand, der nach 10minütigem Zentrifugieren bei 13000rpm (Heraeus, Tischzentrifuge Biofuge pico) entstand, wurde in ein neues Tube überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 3.10.1). In der Zwischenzeit wurden die mit anti-FLAG-Antikörper gekoppelte Agarose (Sigma) entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Anschließend wurden die Mikropartikel mit der größtmöglichen Proteinmenge versetzt und auf einem Überkopf-Schüttler (Elmi, Rotamix) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Partikel dreimal mit kaltem 1xTBS gewaschen. Dazu wurde bei 10000rpm und 4°C 30sek (Heraeus, Kühlzentrifuge Biofuge fresco) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat in 25µl 5x Laemmli-Auftragspuffer ohne Mercaptoethanol resuspendiert, 5 Minuten bei 96°C denaturiert (Eppendorf, Thermomixer compact) und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der Expression wurden 15µg Ausgangsmaterial auf ein zweites Gel aufgetragen. Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting durchgeführt (vgl. 3.10.2 und 3.10.4). Die Membran mit dem Immuopräzipitat wurde mit einem Antikörper für dasjenige Protein inkubiert, für welches man eine Interaktion mit dem präzipitierten Protein vermutete. Die zweite Membran wurde zum

Nachweis des FLAG-Proteins mit FLAG-Antikörper behandelt. Um sicher zu gehen, daß überall die selbe Menge des mit dem FLAG-Epitop fusionierten Proteins an die Mikropartikel gebunden hat, wurde die erste Membran nach der Detektion mit Stripping-Puffer (Pierce) für 20min inkubiert, mit 1xTBS-T gewaschen, über Nacht geblockt und anschließend das FLAG-fusionierte Protein detektiert (vgl. 3.10.4).

3.11 Proteinexpression und Aufreinigung

Puffer:

Puffer A: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH8,0 mit NaOH

Puffer B: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, pH8,0 mit NaOH

Puffer C: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM Imidazol, pH8,0 mit NaOH

Zur Expression rekombinanter Proteine in E. coli wurde das pPROEx System von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet, das die Expression von Proteinen mit N-terminalem Histidin-Tag mit hohen Ausbeuten erlaubt. Der Vektor besitzt einen Affinitäts-Tag aus sechs Histidinen, einen 7 AS langen "Spacer" Arm, eine TEV Erkennungssequenz für das Abspalten der Histidine nach der Proteinisolierung und anschließend eine multiple Klonierungsstelle. Bei der Klonierung mußte darauf geachtet werden, daß die cDNA in den Leserahmen kloniert wurde. Die zu exprimierende cDNA von FKBP51 und FKBP52, jeweils mit einem C-terminalen FLAG versehen, wurde über die Schnittstellen Not I und XbaI in den pPROEx HTa-Vektor kloniert. Der trc Promotor und das lacI^q Gen ermöglichen eine induzierbare Expression des Gens durch IPTG. Die Plasmide wurden in die BL21plys Bakterien transformiert und in 50ml TB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 25ml in 400ml frisches TB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde mit 2mM IPTG (Endkonzentration) für 2-3 Stunden induziert. Die Bakterien wurden unter Kühlung bei 5000rpm 15min abzentrifugiert (Beckman, J2 MC, Rotor JA-14) und das Pellet im Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren. Das Pellet wurde in 8ml Puffer A mit $1/200$ Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch 3-4 fache Ultraschallbehandlung für 10 Sekunden, bis die Suspension nicht mehr schlierig erschien. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Lysat erfolgt mit Hilfe der Ni-NTA®-Matrix von Qiagen. Das Trägerharz ist ein Agarosederivat, an das kovalent der vier-zählige Chelatligand Nitrilotriessigsäure (engl.: nitrilotriactic acid, NTA) gebunden ist. Die NTA-Gruppe belegt vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Ni(II)-Ions, so daß die zwei verbleibenden Koordinationsstellen eine Wechselwirkung mit den Imidazolresten des Hexahistidin-fusionierten Proteins ermöglichen. Die Hexahistidin-Fusionsproteine können vom Ni-NTA-Harz durch Zugabe eines komplexierenden Liganden,

in diesem Fall Imidazol, dessen höhere Affinität zum Metallion zur Verdrängung der Imidazolreste aus der Koordinationssphäre führt, eluiert werden.

Die Suspension wurde bei 13000rpm für 20min bei 4°C zentrifugiert (Heraeus, Kühlzentrifuge Biofuge fresco) und der Überstand wurde mit 1ml Ni-NTA-Agarose-Säule bei 4°C eine Stunde rotiert (Elmi, Rotamix). Das Säulenmaterial wurde mittels Zentrifugation (1000rpm, 1min, 4°C, Kühlzentrifuge Biofuge fresco) gesammelt und in 4ml PufferB aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt, wobei der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Ni-NTA-Harz mit 500µl Elutionspuffer C versehen, vorsichtig geschüttelt und bei 1000rpm 1min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Mittels SDS-PAGE konnte die Ausbeute und Sauberkeit kontrolliert werden. Um den Histidin-Tag zu entfernen, konnte eine proteolytische Spaltung mit der rTEV Protease (Invivogen) durchgeführt werden, weil der Vektor eine Tobacco Etch Virus (TEV) Protease Erkennungssequenz enthält.

Ansatz:

500 µl	1.Eluat
37,5µl	TEV-Puffer
7,5 µl	0,1M DTT
5,0 µl	Protease
<u>200 µl</u>	<u>dH₂O</u>
750 µl	Endvolumen

Falls die Spaltung nicht vollständig war, konnte nochmals über die Ni-Säule aufgereinigt werden. Das Protein wurde über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung kontrolliert und bei -80°C aufbewahrt.

"Der Worte sind genug gewechselt.
Lasst mich endlich Taten sehen!"
aus Goethes Faust

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines zellulären Systems zur Messung der Aktivität von Hormonrezeptoren

Um den Effekt der einzelnen Cofaktoren auf den GR und auf andere Substrate von Hsp90 zu untersuchen, war es zunächst wichtig, ein Meßsystem zu etablieren, um die Responsivität der Rezeptoren meßbar zu machen. Hierzu nutzt man allgemein die Fähigkeit der Steroidrezeptoren, als Transkriptionsfaktoren zu agieren. In einem Reporter-Assay verwendet man sogenannte Reportergene, z.B. Luciferase, deren Expression von Promotoren kontrolliert wird, die artifizielle oder natürliche Bindungsstellen des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors aufweisen. Der MMTV (mouse mammary tumor virus)-Promotor weist solche Bindestellen für Steroidrezeptoren (Hormon responsive Elemente=HREs) auf und wurde für die Expression der Luciferase in dieser Arbeit verwendet. Ist der GR in der Lage, an die HREs zu binden, dann wird die Transkriptionsrate der Luciferase erhöht. Da die Aktivität der Luciferase durch die Umsetzung von Luciferin schon bei geringen Mengen bestimmt werden kann, stellt die Luciferase des Glühwürmchens somit allgemein einen sensitiven Reporter zur Quantifizierung der Aktivität von Promotoren dar (vgl. Abschnitt 3.7). Mit dieser Methode kann nun die Funktion der einzelnen Hsp90-Cofaktoren auf den GR untersucht werden. Um sicher zu stellen, daß die gemessenen Effekte nicht von der Zelllinie oder der Transfektionsmethode abhängig sind, wurden verschiedene Zelllinien und Transfektionsmethoden getestet. Die Abbildungen zeigen einen Vergleich der Rezeptorantwort auf Hormon unter den jeweils gegebenen Bedingungen. Die Aktivitäten in Abwesenheit von Hormon wurden stets ermittelt, werden aber nur dargestellt wenn sich ein Effekt durch die Zugabe eines Cofaktors ergab wie in Abb. 9A.

4.2 FKBP51 hemmt spezifisch Corticoidrezeptoren

Überexpression von FKBP51 in humanen Zellen resultiert in einer Hemmung der durch den GR gesteuerten Transaktivierung (Abb. 7A). Dieser Effekt ist unabhängig von der verwendeten Zelllinie, weil die Reduktion in Sk-N-MC, HEK, HeLa und Cos-Zellen beobachtet wurde. Im Gegensatz zu FKBP51 zeigt FKBP52, welches zu FKBP51 sehr

homolog ist, im gleichen Untersuchungsansatz keine Wirkung auf den GR. Damit wirken die beiden Immunophiline unterschiedlich auf den GR. Es wurde kein Effekt auf die hormonunabhängige Aktivität des Rezeptors gefunden, d. h. die mit β -Galaktosidase korrigierten Luciferasewerte ohne Hormon mit und ohne transfiziertem Immunophilin unterschieden sich nicht. Aus diesem Grund wurde in Abb. 7A die berechnete prozentuale Stimulierung aufgetragen.

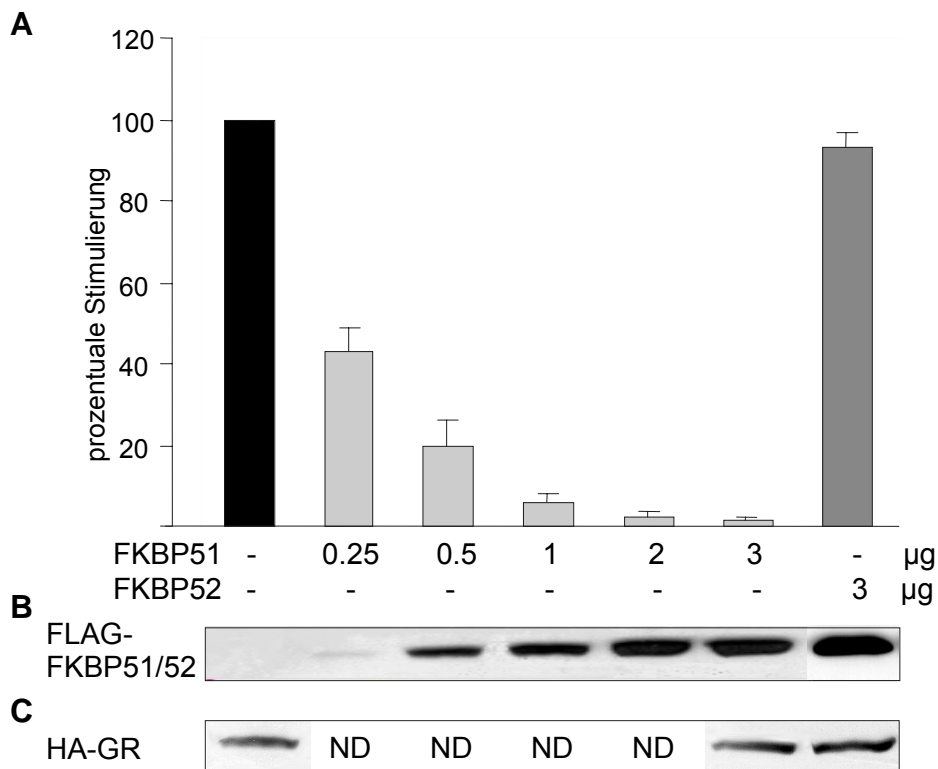


Abb. 7: FKBP51 hemmt die GR-abhängige Transkription.

SK-N-MC wurden mit einem MMTV (mouse mammary tumor virus)-kontrollierten Luciferase Reporterplasmid (MTVLuc), einem GR exprimierenden Plasmid (pRK7GR), einem β -Galaktosidase Kontrollplasmid, und den angegebenen Mengen eines FKBP51-Expressionsplasmids transfiziert. Für den letzten Balken wurde statt FKBP51 ein FKBP52 exprimierendes Plasmid eingesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16Std, mit Ethanol bzw. 10nM Cortisol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- sowie β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. **A:** Gezeigt sind die mit β -Galaktosidase normalisierten Luciferase-Werte, berechnet als prozentuale Stimulierung + SEM aus drei unabhängigen Experimenten. **B:** Repräsentativer Western-Blot des mit einem FLAG-Epitop fusionierten Immunophilins **C:** Repräsentativer Western-Blot des HA-fusionierten GRs. Für die gezeigten Western-Blots wurden jeweils die Proben, die für die Luciferase-Messung verwendet wurden, aufgetragen. Bedingungen, die nicht untersucht wurden sind mit ND (nicht dedektiert) gekennzeichnet.

Die Immunophiline, die in den meisten Experimenten verwendet wurden, waren C-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert, um die Detektion zu erleichtern und sie besser von den endogenen Proteinen abzugrenzen (Abb. 7B). Parallel dazu wurden auch die Wildtyp-Varianten ohne FLAG-Epitop untersucht. Es zeigte sich, daß Fusionierung der beiden Immunophiline mit einem FLAG keinen Einfluß auf die Funktion hatte (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, daß Überexpression von CHIP, einem anderen TPR-Protein des Hsp90-Heterokomplexes, zum Abbau des GRs durch den Proteasomkomplex führt (Connell et al., 2001). Um zu untersuchen, ob auch FKBP51 solch einen Abbau induziert und somit auf diesem Wege zu einer Reduktion der Transaktivierung des Rezeptors führt, wurde die Menge an GR mittels Western ermittelt. Dabei zeigte sich, daß weder FKBP51 noch FKBP52 die Menge an GR veränderte (Abb. 7C). Damit kann ein Abbau als mögliche Ursache für die beobachtete Hemmung des GRs ausgeschlossen werden.

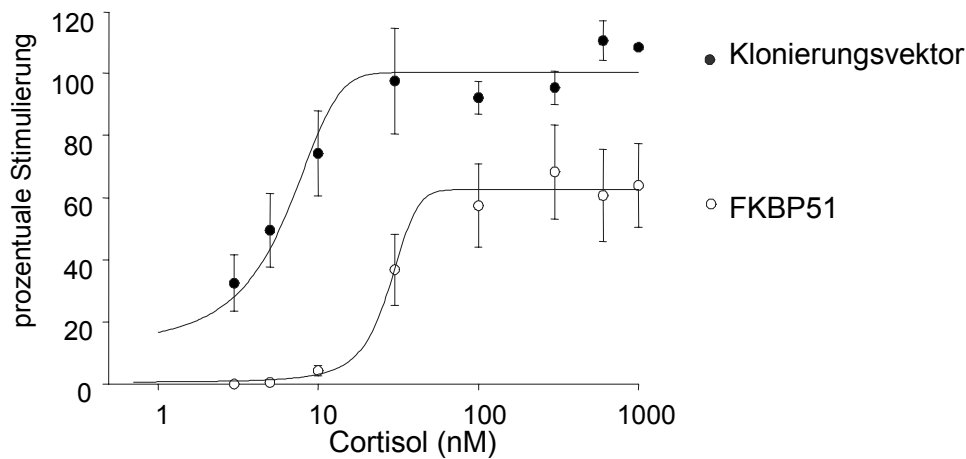


Abb. 8: Effekt von FKBP51 bei unterschiedlichen Cortisol-Konzentrationen.

Sk-N-MC-Zellen wurden mit MTV-Luc, pRK7-GR, pCMV- β Gal und 3 μ g FKBP51 exprimierendem Plasmid oder 3 μ g Klonierungsvektor pRK5-SV40PURMC transfiziert. Gezeigt sind die mit β -Galaktosidase normalisierten Luciferase-Werte, berechnet als prozentuale Stimulierung \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Der reduzierende Effekt von FKBP51 wurde zusätzlich bei unterschiedlichen Hormonkonzentrationen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß bei erhöhten Mengen von FKBP51 höhere Konzentrationen an Cortisol nötig sind, um die selbe Hormonantwort beim GR auszulösen (Abb. 8). Dies ist konsistent mit dem Ergebnis einer während dieser Arbeit publizierten Studie, die eine Veränderung der K_d der Hormonbindung des GRs mit FKBP51 beobachtet hat (Denny et al., 2000). Im Gegensatz zu dieser Publikation konnte in der vorliegenden Untersuchung auch bei Sättigungskonzentration von Cortisol eine reduzierte Stimulierung beobachtet werden (Abb. 8). Aus diesem Ergebnis kann man vermuten, daß

der inhibitorische Effekt von FKBP51 nicht allein auf eine reduzierte Hormonbindung des GRs zurückgeführt werden kann, weil sonst bei Ligandensättigungskonzentration keine Hemmung zu erwarten wäre.

Um die Frage zu beantworten, ob FKBP51 ein genereller Inhibitor von Hsp90-abhängigen Transkriptionsfaktoren ist oder nur bestimmte Rezeptoren betroffen sind, wurde der Effekt auf den MR, den Progesteronrezeptor (PR), den Androgenrezeptor (AR), den Östrogenrezeptor (ER) und den Hitze-Schock-Faktor-1 (HSF-1) untersucht. Es wurde derselbe Reporter-Gen-Assay wie beim GR verwendet (vgl. Abschnitt 3.7.3). Bei der Untersuchung des MRs wurde Fludrocortison, ein synthetisches Mineralocorticoid, als Ligand verwendet. Es ist bekannt, daß Fludrocortison eine 15-fach höhere Affinität zum MR besitzt als der natürliche Ligand Aldosteron (Agarwal et al., 1977). Überexpression von FKBP51 hemmte die hormonunabhängige Transaktivierung des MRs in HEK-Zellen (Abb. 9A, vgl. – und 3 µg FKBP51 in Abwesenheit von Hormon) und in einem geringeren Maße auch die hormonabhängige Aktivität, während FKBP52 wie beim GR keinen Effekt zeigte (Abb. 9A). Um diese Ergebnisse korrekt darzustellen, sind in Abbildung 9A die mit β-Galaktosidase normalisierten Luciferasewerte gezeigt. Darstellung der Resultate als prozentuale Stimulierung, d.h. der Rezeptorantwort auf Hormon, wie in den anderen Abbildungen würde wegen des Effekts auf die hormonunabhängige Aktivität eine irreführende Interpretation ergeben. Eine solche Darstellung würde den Eindruck vermitteln, daß FKBP51 den MR stimuliert (vgl. Verhältnis +/- Fludrocortison in Abb. 9A). In einem Vergleich der Stimulierungen kann ein Effekt auf den unaktivierten (d.h. Hormon-unabhängigen) Rezeptor nicht dargestellt werden. In allen anderen Experimenten ist der unmittelbare Vergleich der Stimulierungen nur deshalb möglich, weil sich kein Effekt auf die hormonunabhängigen Aktivitäten zeigte, und damit der Bezugspunkt für die Stimulierung gleich bleibt.

Aus dem Experiment kann geschlossen werden, daß FKBP51 die beiden Corticosteroidrezeptoren in ihrer Aktivität hemmt, den GR in seiner Antwort nach Hormongabe und den MR vor allem in seiner hormonunabhängigen Aktivität.

Zur Feststellung der Wirkung von FKBP51 auf den PR und den AR wurde derselbe Experimentaufbau verwendet wie beim GR verwendet. In HEK-Zellen wurde in beiden Fällen keine Veränderungen der hormonunabhängigen Aktivität beobachtet. Auch nach Stimulation mit Progesteron bzw. Dehydrotestosteron wurde keine Effekt von FKBP51 auf den PR bzw. AR gemessen (Abb. 9B und 9C).

Auch der Östrogenrezeptor (engl.: estrogen receptor; ER) wurde nicht von FKBP51 beeinflusst. In diesem Experiment wurde die Luciferase durch einen Promotor reguliert, der Östrogen-responsive Elemente enthält (ERE-Luc) und es wurden MCF-7 Zellen verwendet, die endogen ER exprimieren (Abb. 9D). Da sich auch hier kein Einfluß auf den

hormonungebundenen Rezeptor feststellen ließ, konnten die Resultate als prozentuale Stimulierung dargestellt werden.

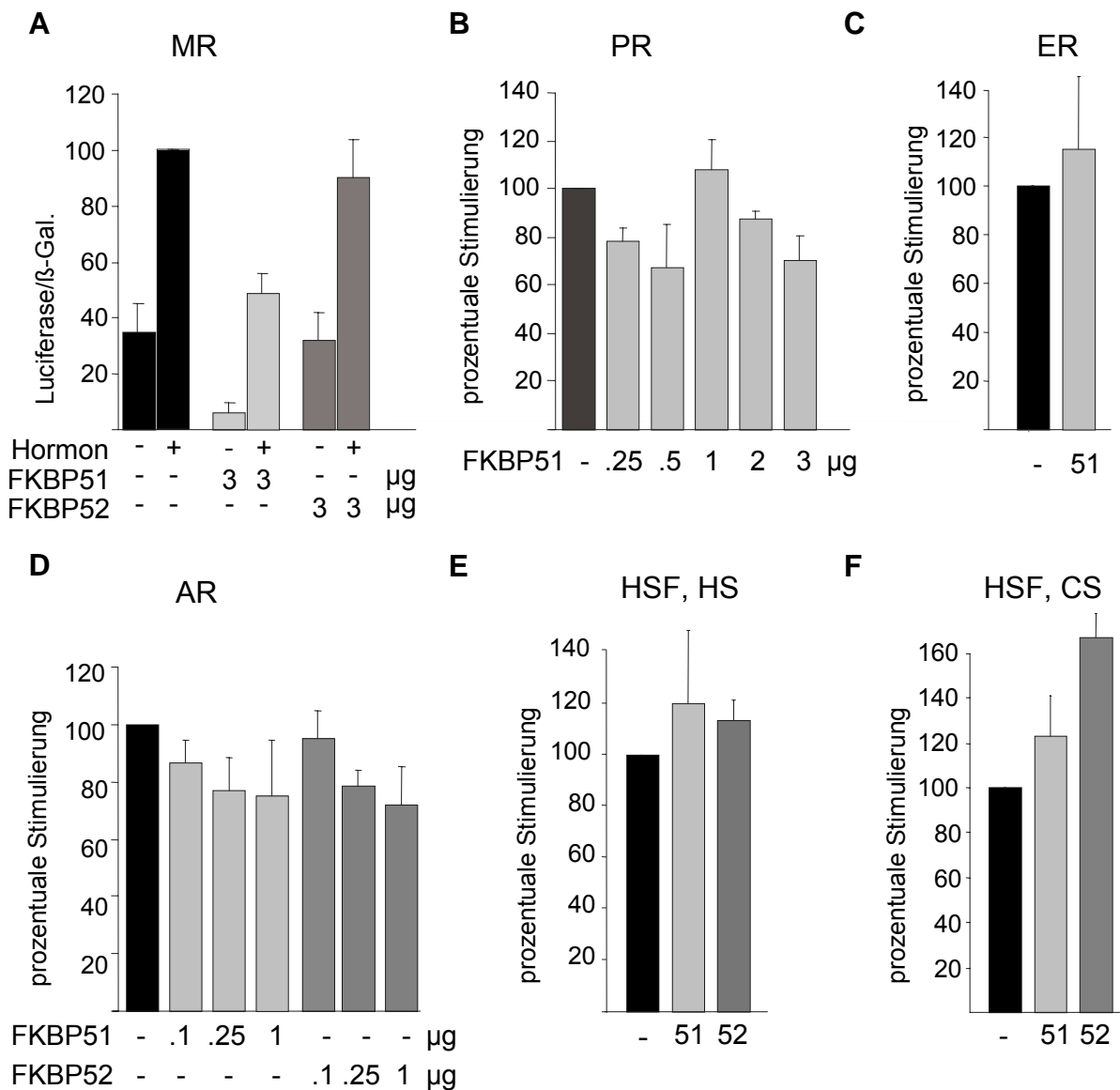


Abb. 9: FKBP51 hemmt spezifisch die Corticoidrezeptoren.

HEK (A) oder SK-N-MC (B, D) Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, dem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid und mit den angegebenen Mengen eines für FKBP51 bzw. für FKBP52 kodierenden Plasmids und entweder 0,75 μ g MR- (A), 1 μ g PR- (B) oder 1 μ g AR-Plasmid (D) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3nM Fludrocortison (A), 10nM Progesteron (B) oder 100nM Dihydrotestosteron (D) für 16Std stimuliert. Die gezeigten Daten entsprechen vier (A, B) bzw. fünf (D) gemittelten Experimenten + SEM dargestellt **C**: MCF-7 Zellen wurden mit einem ERE-abhängigen Reporterplasmid (ERE-Luc), einem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid und 3 μ g eines FKBP51 exprimierenden Plasmids transfiziert. Die Zellen wurden für 20Std mit 100nM Östradiol stimuliert

und die prozentuale Stimulierung aus drei Experimenten + SEM berechnet. **E, F:** SK-N-MC Zellen wurden mit einem HSF-1-abhängigen Reporterplasmid (HSF-Luc), mit dem für die β -Galaktosidase kodierenden Plasmids und 1 μ g des Immunophilin exprimierenden Plasmids transfiziert. Nach 24Std wurden die Zellen entweder bei 42°C für 30min (E) oder mit 200 μ M Natriumarsenit für 1Std behandelt (F). 16Std nach der Stimulierung wurde die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Luciferase-Werte wurden mit β -Galaktosidase kontrolliert und mit den Werten der unbehandelten Zellen wurde der Induktionfaktor berechnet. Es sind die Mittelwerte von je fünf Experimenten für den Hitze-Schock (HS, E) und drei für den chemischen Stress (CS, F) + SEM dargestellt. Die Luciferase-Aktivität wurde entweder als mit β -Galaktosidase normalisierte Werte (A) oder als prozentuale Stimulierung (B-F) dargestellt, wobei die schwarzen Balken immer den Klonierungsvektor, die hellgrauen Balken FKBP51 und die dunkelgrauen FKBP52 repräsentieren.

Beide Immunophiline wurden auch auf ihre Funktion für die HSF-1-vermittelte Transkription untersucht. Dabei wurde die Luciferase durch einen Promotor induziert, der HSF-1-abhängige Bindungsstellen (HRE-Luc) aufweist. HSF-1 kann durch Hitze oder chemischen Stress aktiviert werden. Sk-N-MC Zellen wurden deshalb entweder 30min bei 42°C oder durch Behandlung mit Natriumarsenit stimuliert. Beide FKBP5s beeinflussten weder die durch Hitze (Abb. 9E) bzw. durch chemischen Stress (Abb. 9F) induzierte HSF-1-abhängige Transkription, noch lösten sie alleine eine Stressantwort aus.

Aus all diesen Experimenten läßt sich schließen, daß FKBP51 spezifisch die beiden Corticoidrezeptoren hemmt und keinen Einfluß auf andere Steroidrezeptoren oder HSF-1 hat.

4.3 Der Effekt von FKBP51 ist abhängig von der Interaktion mit Hsp90

Das Ergebnis des Abschnitts 4.2, daß die meisten Substrate von Hsp90 nicht durch FKBP51 beeinflusst werden, wirft die Frage auf, ob der beobachtete Effekt von FKBP51 wirklich über Hsp90 vermittelt wird, oder ob FKBP51 andere Signalwege stimuliert, die wiederum auf den GR zurückwirken. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Doppelpunktmutation in der TPR-Domäne von FKBP51 eingeführt. Eine analoge Mutation in PP5, einem anderen TPR-Protein, hat gezeigt, daß dieses Protein nicht mehr mit Hsp90 interagieren kann (Russell et

al., 1999). Analog dazu wurden in der TPR-Domäne von FKBP51 das Lysin in Position 352 und das Arginin in Position 356 zu Alanin mutiert. Wie in Abb. 10C zu sehen ist, kann dieses

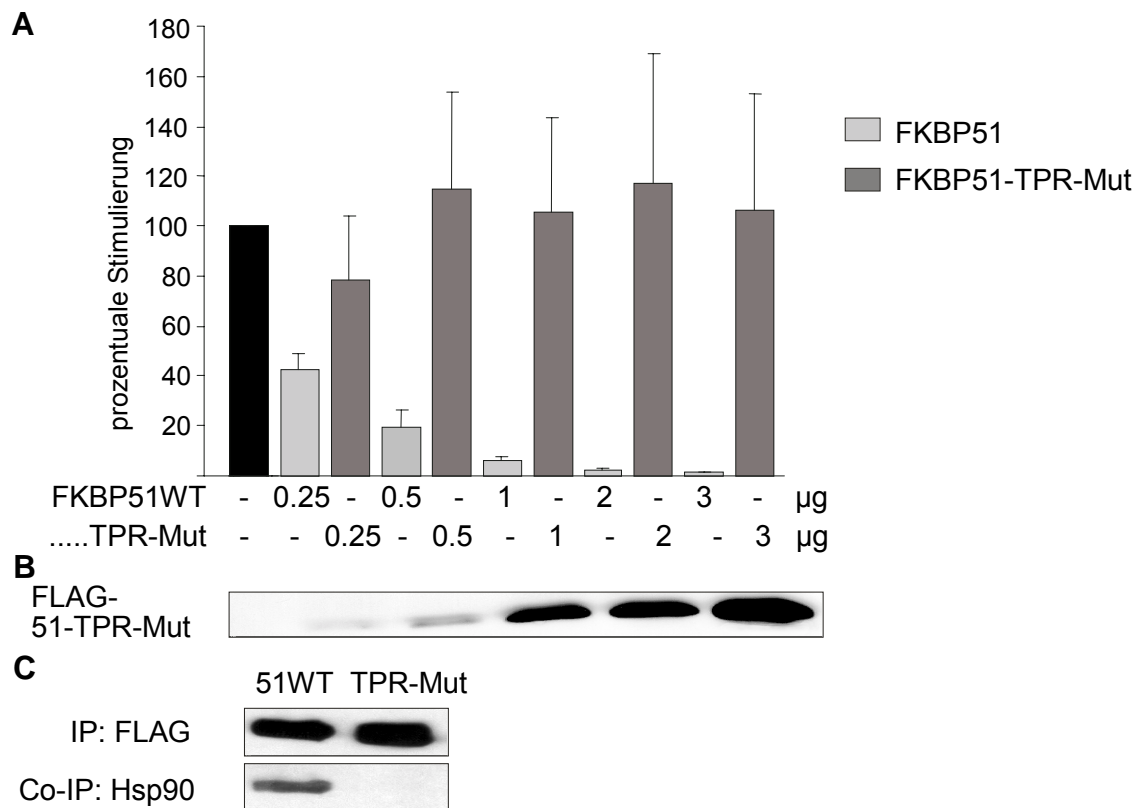


Abb. 10: Die Interaktion von FKBP51 mit Hsp90 ist notwendig für die Hemmung des GRs

SK-N-MC Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, dem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid, dem GR-Expressionsplasmid (pRK7-GR), Konierungsvektor (schwarzer Balken) und steigenden Mengen an FKBP51-Plasmid (graue Balken) bzw. einer Mutante von FKBP51 mit einem zweifachen AS-Austausch in der TPR-Domäne (K352A/R356A, dunkelgraue Balken) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10nM Cortisol für 16Std inkubiert. **A:** Die gemessenen und mit β -Galaktosidase kontrollierten Luciferase-Werte wurden zur Berechnung der prozentualen Stimulierung herangezogen. Die Mittelwerte von je fünf unabhängigen Experimenten + SEM sind dargestellt. **B:** Repräsentativer Western-Blot der Proben, die für die Aktivitätsbestimmung hergestellt wurden. Zu sehen sind die ansteigenden Mengen der mit einem FLAG-Epitop fusionierten TPR-Mutante von FKBP51 **C:** Western-Blot einer Immunopräzipitation mit anti-FLAG gekoppelten Partikeln. Die Membran wurde zuerst mit dem hsp90-Antikörper inkubiert, um die Hsp90-Bindung der Proteine nachzuweisen und anschließend mit dem FLAG-Antikörper, um die Effizienz der Präzipitation zu kontrollieren.

Protein nicht mehr an Hsp90 binden. Es wird im selben Maße exprimiert wie das Wildtyp-FKBP51 (Abb. 10B und 10C), führt aber zu keiner Hemmung der GR-abhängigen Transaktivierung (Abb. 10A). Daraus kann geschlossen werden, daß die Interaktion mit Hsp90 notwendig für die Hemmung der GR-vermittelten Transaktivierung durch FKBP51 ist. Die Notwendigkeit der Bindung an Hsp90 konnte auch mit einem GR, dem die LBD fehlt, bestätigt werden. In der LBD ist auch die Interaktionsstelle für Hsp90 lokalisiert, d.h. der trunkierte GR (GR1-515) ist von Hsp90 unabhängig und konstitutiv aktiv. FKBP51 zeigt keinen Effekt auf diesen GR. (Abb. 11).

Diese Experimente belegen, daß FKBP51 über seine Interaktion mit Hsp90 zu einer Hemmung der GR vermittelten Transaktivierung führt.

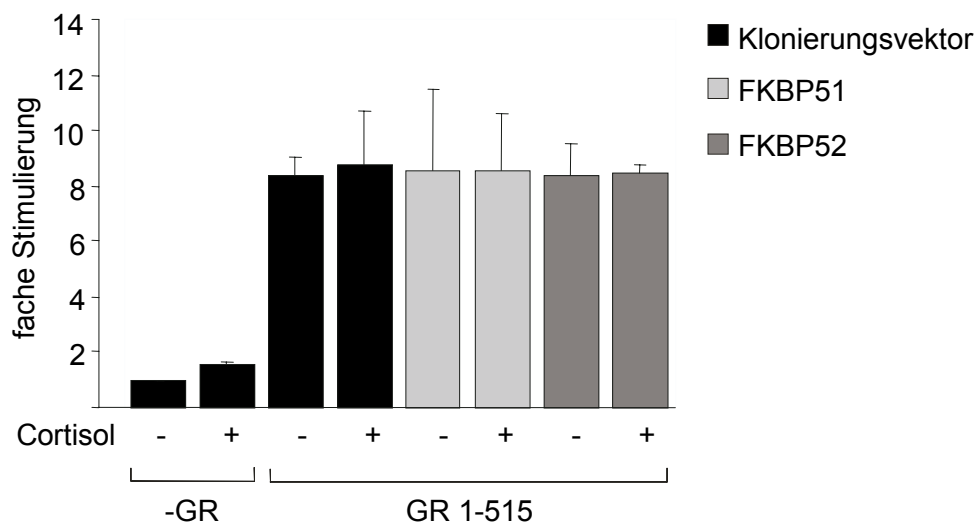


Abb. 11: Ein GR, dem die Liganden-Bindungsdomäne fehlt, ist von FKBP51 unabhängig

SK-N-MC Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, dem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid, 2 μ g des Expressionsplasmid für die trunkierte Variante des GRs (pRK5-GR1-515) und 1 μ g des entsprechenden Immunophilin-Plasmids transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16Std mit 10nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert. Die dargestellten Daten entsprechen den mit β -Galaktosidase kontrollierten Luciferase-Werten (Zellen ohne cotransfiziertem GR und Hormon wurden auf 1 gesetzt) von drei unabhängigen Experimenten + SEM.

4.4 FKBP52 antagonisiert den Effekt von FKBP51

In vitro (Nair et al., 1997) und in Hefe (Riggs et al., 2003) wurde gezeigt, daß die einzelnen TPR-Proteine miteinander um die Bindung an Hsp90 konkurrieren. Daher müßte es möglich sein, den hemmenden Effekt von FKBP51 mit steigenden Mengen von FKBP52, welches

keinen Effekt auf die GR-vermittelte Transaktivierung zeigt, rückgängig zu machen. Dazu wurden HEK-Zellen mit einer konstanten Menge an FKBP51 transfiziert und schließlich die Menge von FKBP52 Schritt für Schritt erhöht. Es zeigt sich wie erwartet, daß FKBP52 den hemmenden Effekt von FKBP51 aufheben kann (Abb. 12A). Das Expressionsniveau von FKBP51 wurde konstant gehalten, während die FKBP52-Konzentration ansteigt (Abb. 12B). Ein anderes TPR-Protein, PP5, war nicht in der Lage, den Effekt von FKBP51 aufzuheben. Cotransfektion von PP5 allein reduzierte wie FKBP51 die GR-vermittelte Transkription (Abb. 12C).

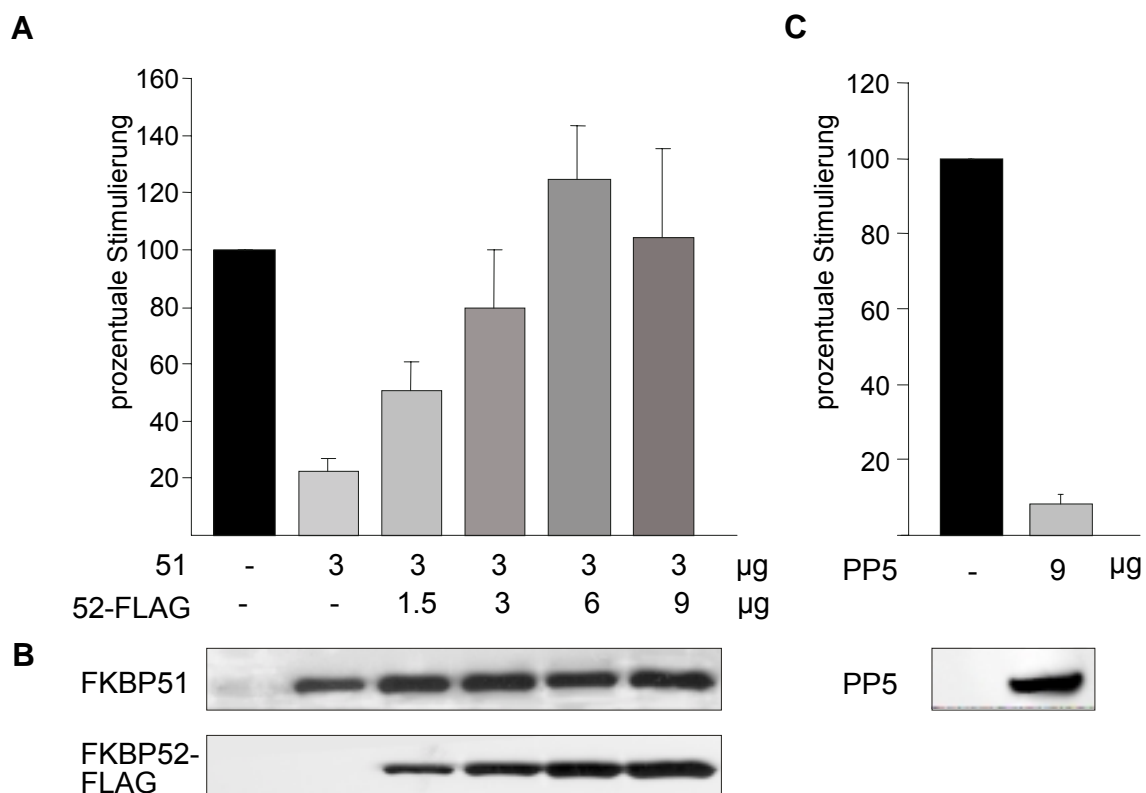


Abb. 12: FKBP52 revertiert den hemmenden Effekt von FKBP51 auf den GR.

HEK-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, dem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid, dem GR-Expressionsplasmid (pRK7-GR), 3 μ g des FKBP51 exprimierenden Plasmids und steigende Mengen des FKBP52-Plasmids transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16Std mit 10nM Cortisol inkubiert. **A:** Die Luciferase-Daten wurden mit β -Galaktosidase normalisiert und als prozentuale Stimulierung von drei unabhängigen Experimenten + SEM dargestellt. **B:** Repräsentativer Western-Blot des FKBP51 und des mit einem FLAG-Epitop fusionierten FKBP52. **C:** HEK Zellen wurden wie bei A transfiziert aber statt des Immunophilin-Plasmids wurde ein PP5-exprimierendes Plasmid verwendet. Die Daten wurden wie bei A beschrieben dargestellt. Im unteren Teil ist die Expression eines FLAG-fusionierten PP5 zu sehen.

4.5 Reduktion der endogenen Mengen von FKBP52 hat keinen Effekt auf die Aktivität des GRs

Eine vor kurzem erschienene Publikation untersuchte die Effekte von FKBP51 und FKBP52 auf die GR-vermittelte Transaktivierung in Hefe (Riggs et al., 2003). Im Gegensatz zu Säugetierzellen besitzt Hefe nicht alle bekannten Hsp90-Cochaperone und -Cofaktoren (vgl. Tabelle 1.5). Aus diesem Grund ist die in Hefe gemessene basale GR-Aktivität nur gering. Wie berichtet wurde erhöht die zusätzliche Expression von humanem FKBP52 in Hefe die GR-vermittelte Transaktivierung deutlich, während FKBP51 keinen Einfluß hat (Riggs et al., 2003). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den in dieser Arbeit vorgestellten Daten, da die zusätzliche Expression von FKBP52 in humanen Zellen keinen Effekt zeigte. Dies läßt sich mit der Annahme erklären, daß die in Säugetierzellen enthaltenen Mengen an FKBP52 oder funktionsgleicher Proteine ausreichend sind für eine optimale GR-abhängige Transaktivierung.

Nimmt man an, daß FKBP52 das einzige TPR-Protein in Säugetieren ist, welches fördernd auf die Transaktivierung des GRs wirkt, sollte eine Reduktion der endogenen Menge von FKBP52 zur einer Hemmung der GR-Aktivität führen. Mit Hilfe der RNAi-Technik war es möglich, zwei Sequenzen von FKBP52 zu identifizieren, die die Menge an FKBP52 um 50-70% reduzierten (Abb. 13A). Diese Konstrukte veränderten die Funktionalität des GRs im Transaktivierungsassay nicht (Abb. 13B). Möglicherweise war die verbleibende Menge an FKBP52 noch ausreichend, um die volle Funktionsfähigkeit des GRs zu gewährleisten. Die Existenz von anderen mit FKBP52 funktionsgleichen Faktoren ist auch denkbar. Erst in Anwesenheit von zusätzlich coexprimiertem FKBP51 zeigte die Verminderung von FKBP52 Mengen einen Effekt auf die Hormonantwort des GRs (Abb. 13C). Die Verwendung der FKBP52-RNAi-Konstrukte reduziert die bereits durch FKBP51 verminderte GR-Transaktivität (in Abb. 13C auf 100 gesetzt) weiter.

Dieses Ergebnis unterstützt die These, daß in Säugetieren im Gegensatz zu Hefe optimale Bedingungen für die GR-Aktivität gegeben sind, zumindest im Hinblick auf den von den Immunophilinen notwendigen Beitrag. Veränderungen der FKBP52-Menge in beide Richtungen, einerseits durch Überexpression (vgl. Abschnitt 4.2) oder andererseits durch Verminderung mittels RNAi-Technik zeigen keinen Effekt. Im Hinblick auf die Bedeutung der Steroidsignaltransduktion in Säugetieren garantiert solch ein optimiertes System die Funktionalität der Corticoidrezeptoren (vgl. Diskussion).

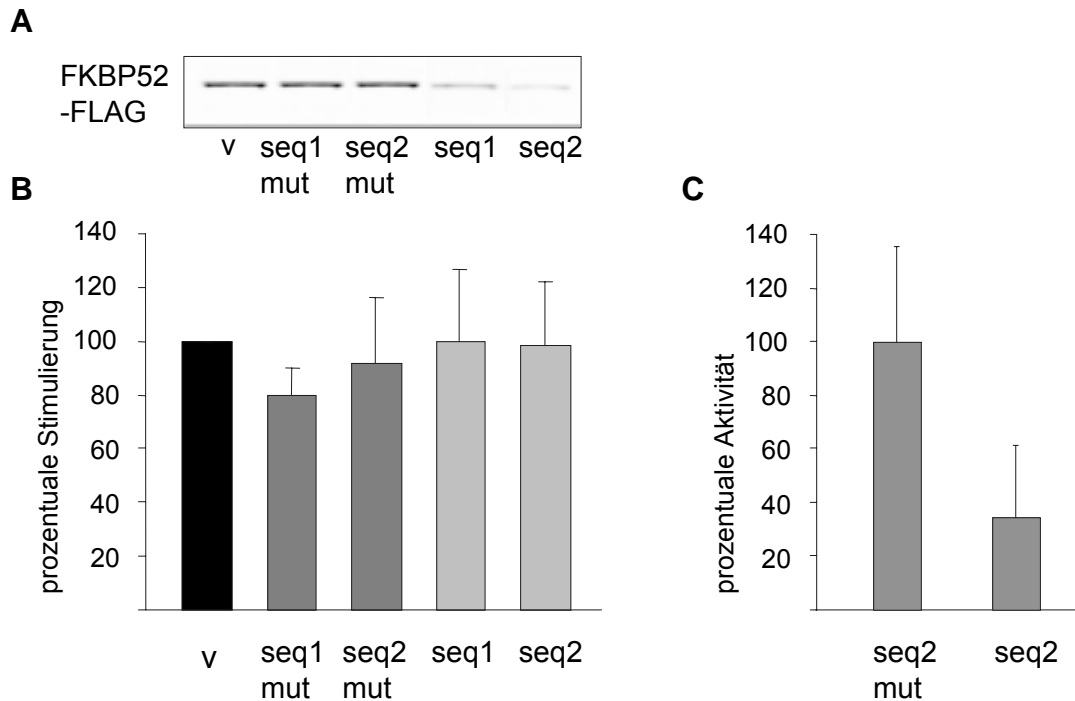


Abb. 13: Reduktion der endogenen FKBP52 Menge mittels RNAi

A: HEK Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid, welches für das mit einem FLAG-Epitop fusionierte FKBP52 kodiert, Klonierungsvektor (v) und einem Expressionsvektor für die RNAi Sequenzen gegen die mRNA von FKBP52 gerichtet oder Mutanten davon transfiziert. Die Mengen von FKBP52 wurden mittels Western-Blot analysiert. **B:** Reportergen-Assay in HEK-Zellen, die mit MTV-Luc, β -Gal, pRK7-GR und entsprechend RNAi-Klonierungsvektor transfiziert wurden (v) bzw. mit RNAi-Vektor mit WT oder mutierten Sequenzen **C:** Reportergen-Assay in HEK-Zellen, wie bei B, aber mit Cotransfektion von 3 μ g FKBP51-Expressionsplasmid und entsprechenden RNAi-Klonen. Luciferase-Daten wurden mit β -Galaktosidase normalisiert und die prozentuale Stimulierung berechnet. Es sind die Werte von je fünf (B) bzw. vier (C) Experimenten gemittelt und + SEM dargestellt.

4.6 FKBP51 reduziert die nukleäre Translokation der CR

Die Literatur gibt Hinweise darauf, daß FKBP52 an der nukleären Translokation des GRs beteiligt ist (Galigniana et al., 1998; Silverstein et al., 1999). So wurde gezeigt, daß FKBP52 mit dem Motorprotein Dynein über die PPlase Domäne interagiert, und daß Überexpression dieser Region in vivo diese Bindung sowie die nukleäre Translokation des GRs verhindert (Galigniana et al., 2002). Es wäre daher möglich, daß FKBP51 nicht oder unzureichend an Dynein bindet und auf diese Weise, zusätzlich zur Verminderung der Hormonbindung (Denny et al., 2000), die Signaltransduktion des GRs beeinflusst. Durch Immunpräzipitation

von FKBP51 und FKBP52, die mit einem FLAG-Epitop versehen waren, konnte gezeigt werden, daß FKBP51 in der Tat schwächer mit Dynein interagiert als sein Homologes FKBP52 (Abb. 14A Mitte).

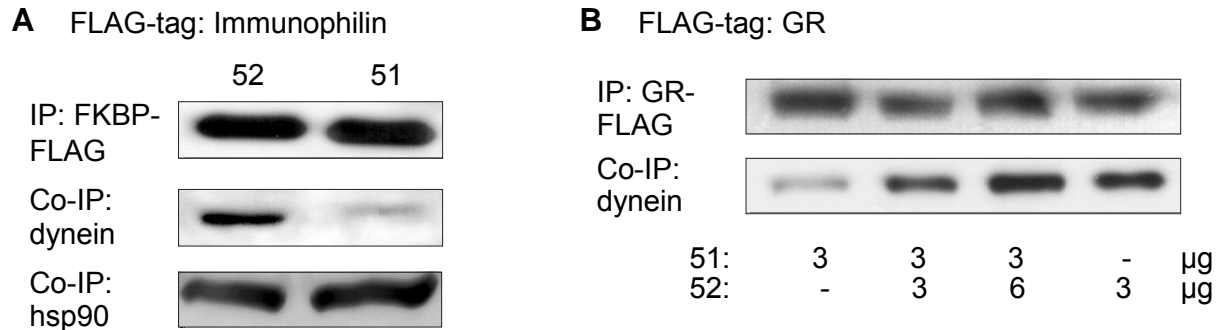


Abb. 14A : FKBP51 bindet schwächer an Dynein als FKBP52

HEK-Zellen wurden mit je 10µg eines FKBP51- bzw. FKBP52-Plasmids transfiziert. Nach 24Std wurden die Zellen lysiert und die mit einem FLAG-Epitop fusionierten Proteine präzipitiert. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots der präzipitierten Immunophilinen sowie des copräzipitierten Dyneins und des copräzipitierten Hsp90s. **B** : HEK Zellen wurden mit 1µg FLAG-fusionierten GR und den jeweils angegebenen Immunophilinen in der entsprechenden Menge transfiziert. Anschließend wurde wie in A beschrieben vorgegangen. Es ist ein repräsentativer Western-Blot gezeigt, der nach der Dedektion von Dynein gestrippt und mit GR-Antikörper behandelt wurde.

Beide Proteine binden im selben Maße an den FLAG-Antikörper (Abb. 14A oben), der an das Säulenmaterial gekoppelt ist, und auch an Hsp90 (Abb. 14A unten), was eine Denaturierung von FKBP51 als möglichen Grund für die schlechtere Dyneinbindung ausschließt. Um die Relevanz der unterschiedlichen Dyneinbindung für den GR zu testen war es wichtig herauszufinden, ob sich dieser Unterschied auch im GR-Heterokomplex widerspiegelt. Um dies zu untersuchen wurde FLAG-fusionierter GR präzipitiert, der entweder mit FKBP51 oder FKBP52 coexprimiert wurde, und die Dynein-Interaktion untersucht. Im Falle von FKBP52 konnte mehr Dynein im Komplex nachgewiesen werden als wenn FKBP51 überexprimiert wurde. Zunehmende Mengen an FKBP52 verdrängen FKBP51 aus dem Heterokomplex wie bereits in Kapitel 4.4 gezeigt (Abb. 12) und erhöhten infolgedessen auch die Menge an Dynein im Komplex (Abb. 14B).

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich die beiden Immunophiline bezüglich ihrer Bindung an Dynein unterscheiden, und daß diese Eigenschaft auch die Anknüpfung des Hsp90-GR-Heterokomplexes an Dynein verändert.

Daraus resultierend kommt man zur Frage, ob die unterschiedliche Interaktion auch zu einer veränderten Translokation der Rezeptoren führt. Die Fusionierung von Proteinen mit GFP (green fluorescence protein) ermöglicht die Lokalisierung dieser Faktoren in der Zelle. Zur Erleichterung der Abgrenzung und Quantifizierung sollte die benutzte Zelllinie über ein ausreichend großes Zytoplasma im Vergleich zum Kern verfügen. Aus diesem Grund wurden alle Lokalisationsuntersuchungen in HeLa-Zellen gemacht. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10nM Cortisol bzw. Lösungsmittel (Ethanol) für eine bestimmte Zeit inkubiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Verteilung des Rezeptors untersucht. Zellen, die mit FKBP51 transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen die FKBP52 exprimierten nach Hormongabe eine deutlich reduzierte nukleäre Translokation des GRs (Abb. 15A). Bezüglich der Lokalisierung des GRs ergab sich kein Unterschied zwischen Zellen, die mit FKBP52, und Zellen, die mit Kontrollvektor transfiziert wurden. Zur Quantifizierung wurden von einem unbeteiligten Beobachter für jede Bedingung mehr als 100 Zellen in Hinblick auf die Verteilung des GRs ausgezählt und in verschiedene Gruppen eingeteilt. Es wurde folgende Einteilung vorgenommen: Zellen, in denen der GR ausschließlich im Zytoplasma zu finden war, wurden der Gruppe 0 zugewiesen, Zellen mit vorwiegend zytoplasmatisch vorliegendem GR der Gruppe 1, bei einer Gleichverteilung des Rezeptors zwischen Zytoplasma und Kern zählte man die Zelle zur Gruppe 2, war der Kern stärker mit GR besetzt als das Zytoplasma wurde die Gruppe 3 gewählt und bei rein nukleär vorkommendem GR wurden die Zellen in die Gruppe 4 eingeordnet. Die Auszählung bestätigte die Beobachtung, daß FKBP51 die nukleäre Lokalisation des GRs nach Hormongabe vermindert (Abb. 15B). Dieses Ergebnis konnte auch für gesättigte Hormonkonzentrationen (1µM Dexamethason) bestätigt werden. In diesem Fall wurde der zeitliche Verlauf des Kerntransportes untersucht, weil in der Literatur gezeigt wurde, daß ein verlangsamter Transport bei einer Behinderung der Bindung von FKBP52 an Dynein erfolgt (Galigniana et al., 2001). Bei gesättigter Hormonkonzentration war die nukleäre Lokalisation des GRs bei Cotransfektion von FKBP51 in den ersten 40min deutlich verzögert und glich sich schließlich nach einer Stunde den FKBP52-transfizierten Zellen wieder an (Abb. 16). Dies bestätigt wiederum die These, daß FKBP51 zusätzlich zur Reduktion der Hormonbindung (Denny et al., 2000) auch den nukleären Transport des GRs behindert, wie durch die verminderte Bindung an Dynein vermutet werden konnte.

Im Falle des MR kann eine Veränderung der Lokalisation des Rezeptors die verminderte hormonunabhängige Aktivität erklären. Beim Betrachten der Verteilung eines GFP-fusionierten MRs stellt man fest, daß bereits vor Hormonbehandlung und Transfektion mit

FKBP52 oder Klonierungsvektor sich ein bedeutender Teil des Rezeptors im Kern befindet. Bei Expression von FKBP51 wird dieser Teil erheblich reduziert, so daß der MR mehr im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 17). Es ist bekannt, daß bei einigen Zelllinien die CRs bereits vor Hormonbindung zu einem signifikanten Anteil im Zellkern gefunden werden können (Brinkmann, 1994). Dieses Ergebnis unterstützt die These, daß FKBP51 unabhängig vom Effekt auf die K_d (Denny et al., 2000) auch die Translokation der CR beeinträchtigt.

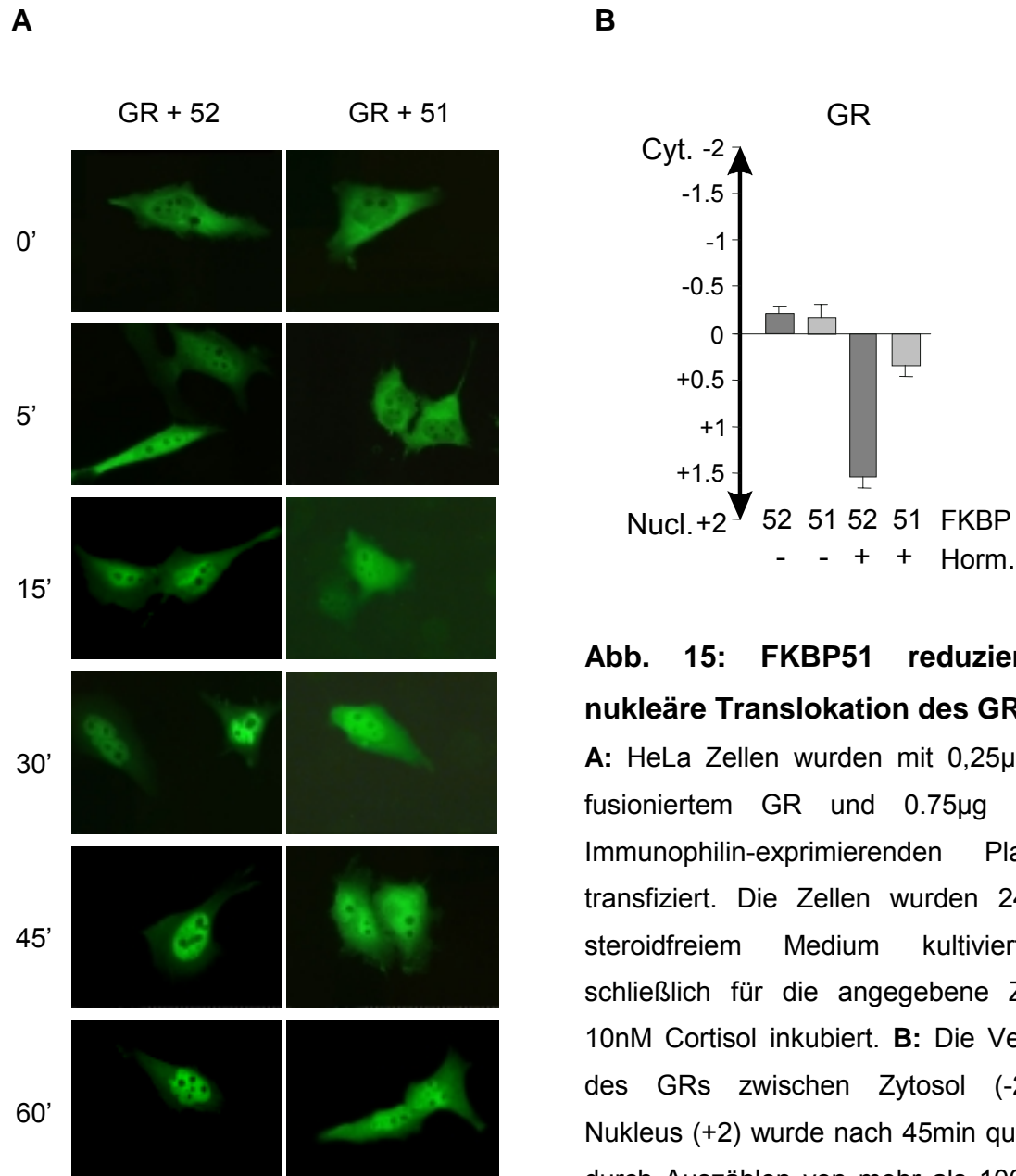


Abb. 15: FKBP51 reduziert die nukleäre Translokation des GR

A: HeLa Zellen wurden mit 0,25µg GFP-fusioniertem GR und 0,75µg eines Immunophilin-exprimierenden Plasmides transfiziert. Die Zellen wurden 24Std in steroidfreiem Medium kultiviert und schließlich für die angegebene Zeit mit 10nM Cortisol inkubiert. **B:** Die Verteilung des GRs zwischen Zytoplasma (-2) und Nukleus (+2) wurde nach 45min quantitativ durch Auszählen von mehr als 100 Zellen bestimmt. Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

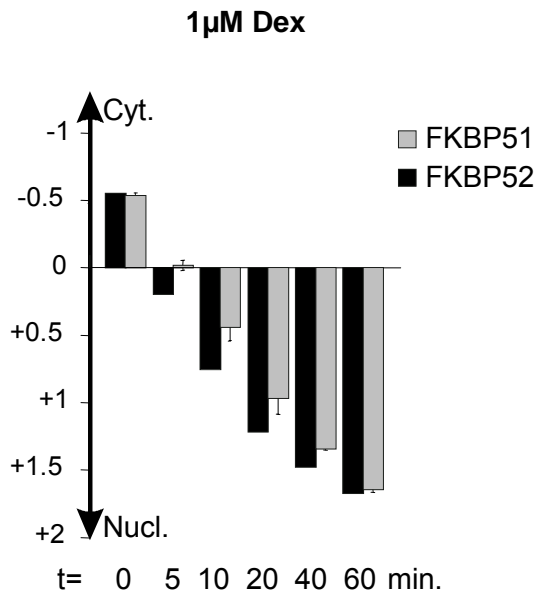


Abb. 16: HeLa Zellen wurden wie bei Abb.15 transfiziert. 24Std nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem Medium, dem entweder 1 μ M Dex oder Ethanol zugesetzt wurde, eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den 37°C - Brutschrank transferiert und nach definierten Zeitpunkten fixiert. Die Verteilung des Rezeptors wurde durch Auszählen quantitativ bestimmt und der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

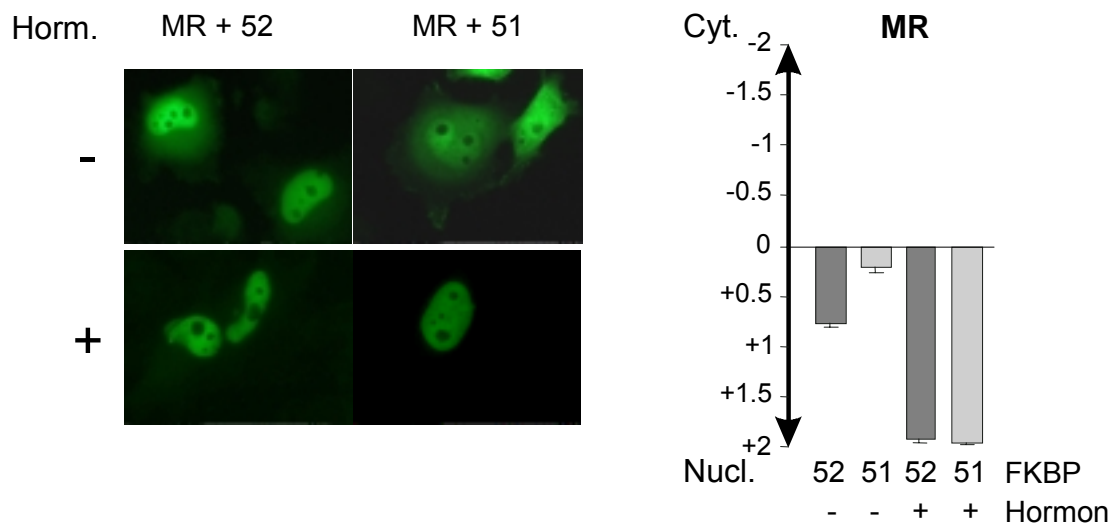


Abb. 17: FKBP51 verändert die Verteilung des unaktivierten MRs in der Zelle

HeLa-Zellen wurden mit 0,25 μ g GFP-fusioniertem MR und 0,75 μ g eines Immunophilin exprimierenden Plasmids transfiziert. Die Zellen wurden 24Std in steroidfreiem Medium kultiviert und schließlich für 45min mit Ethanol oder 10nM Cortisol inkubiert. Die Verteilung des MRs zwischen Zytosol (-2) und Nukleus (+2) wurde quantitativ durch Auszählen von mehr als 100 Zellen bestimmt. Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (rechts).

4.7 Ist die PPlase-Aktivität für die jeweilige Funktion von FKBP52 oder FKBP51 in der CR-Signaltransduktion notwendig?

In Hefe wurde gezeigt, daß die Rotamase-Aktivität von FKBP52 für die in Hefe beobachtete Erhöhung der GR-vermittelten Transaktivierung wichtig ist (Riggs et al., 2003). Um die Frage zu beantworten, inwieweit diese enzymatische Funktion auch für die Effekte in Säugetierzellen nötig ist, wurde FK506 zur Hemmung der PPlase-Aktivität eingesetzt. Aus der Literatur war bekannt, daß an FK506 gebundenes FKBP51 nicht in den Hsp90-Heterokomplex eingebaut werden kann (Smith et al., 1993). Aus diesem Grund wurde angenommen, daß die FK506-Behandlung von FKBP51 überexprimierenden Zellen zu einer Verbesserung der GR-abhängigen Transaktivierung führt. Zusätzlich ließ eine weitere Publikation dieses Ergebnis erwarten: Zytosolische Lymphozytenextrakte von Totenkopffähen zeigten nach Behandlung mit FK506 eine Erhöhung der Hormonbindung des GRs (Denny et al., 2000), was durch Reduzierung des Einbaus von FKBP51 in den Rezeptorkomplex erklärt werden kann.

SK-N-MC-Zellen wurden mit dem für FKBP51 kodierenden Vektor bzw. dem Klonierungsvektor transfiziert. Die Behandlung der Zellen mit FK506 zeigte keinen signifikanten Effekt, weder bei Zellen, die mit Klonierungsvektor, noch bei Zellen, die mit FKBP51-Plasmid transfiziert wurden (Abb. 18). Das aufgrund der Publikationslage erwartete Ergebnis konnte also in Sk-N-MC-Zellen nicht bestätigt werden.

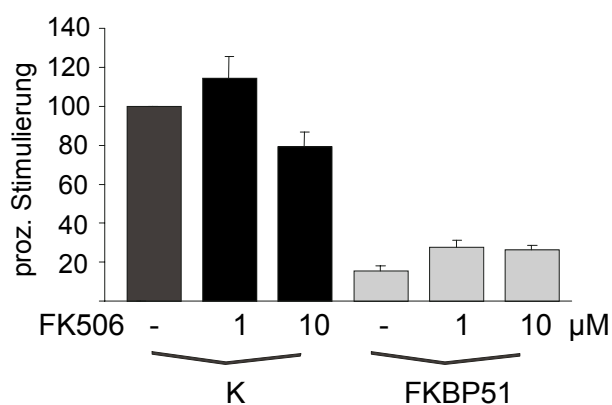


Abb. 18: FK506 hat keinen Einfluß auf die hemmende Funktion von FKBP51

SK-N-MC Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, mit einem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid, pRK7-GR und entweder 1 μ g Klonierungsvektor (K) oder 1 μ g FKBP51-Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurde für 16Std mit 10nM Cortisol und FK506 wie angegeben inkubiert. Luciferase wurde mit den β -Galaktosidase-Werten normalisiert und die prozentuale Stimulierung berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten + SEM.

Einschränkend muß hinzugefügt werden, daß die intrazelluläre Konzentration von FK506 in diesen Versuchen unbekannt blieb, d.h. eine zu geringe Konzentration an FK506 in der Zelle kann als Erklärungsmöglichkeit für das Ergebnis nicht ausgeschlossen werden.

Um die Frage nach dem Beitrag der PPIase-Aktivität der Immunophiline für die GR-Aktivität zu lösen, wurden statt der FK506-Behandlung Punktmutationen in FKBP51 und FKBP52 eingeführt, von denen bekannt ist, daß sie die PPIase-Aktivität um 90% reduzieren (Barent et al., 1998). Dieses Experiment erlaubt eine sichere Interpretation der Resultate. FKBP51, bei dem Phenylalanin und Asparagin in Position 67 bzw. 68 zu Asparagin und Valin mutiert wurden, so daß die Rotamase-Aktivität eingeschränkt ist, reduziert die GR-Funktion im selben Maße wie der WT (Abb. 20A). Daraus kann geschlossen werden, daß die enzymatische Aktivität von FKBP51 für die Hemmung der GR-vermittelten Transaktivierung nicht benötigt wird. Erstaunlicherweise führt die analoge Mutation in FKBP52 zu einer starken Reduktion der GR-abhängigen Transkription (Abb. 19A). Wie auch das wtFKBP51 reduzierte die PPIase-Mutante von FKBP52 die hormonunabhängige Aktivität des MRs und zeigte keinen Effekt auf einen konstitutiv aktiven GR (Daten nicht gezeigt).

Mit diesem interessanten Ergebnis stellte sich die Frage, ob die PPIase-Mutante von FKBP52 noch mit Dynein wechselwirken kann und welchen Effekt sie auf die nukleäre Translokation ausübt. Immunpräzipitationen mit den FLAG-fusionierten Proteinen zeigten, daß die PPIase-Mutante von FKBP52 noch mit Dynein interagiert und war zwar in einem vergleichbaren Maße wie das wtFKBP52 (vgl. Abb. 19D). FKBP51 hingegen besaß eine reduzierte Bindung an Dynein wie bereits vorher gezeigt (vgl. Abschnitt 4.6). Anschließend wurde die Funktion der FKBP52-Mutante auf die nukleäre Translokation hin untersucht. Es zeigte sich, daß die nukleäre Lokalisation des GFP-fusionierten GRs bei Expression der PPIase-Mutante von FKBP52 reduziert war, verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 19B). Die nukleäre Verteilung wurde bei Stimulierung mit 10nM Cortisol für 45min analysiert. Da keine gesättigte Hormonkonzentration verwendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Veränderung der Lokalisation nur eine Folge der reduzierten Hormonbindung des GRs ist.

Weiterhin wurde auch die Lokalisation des MRs bei Überexpression der Rotamase-Mutante von FKBP52 untersucht. Auch in diesem Experiment erhielt man das selbe Ergebnis wie mit dem wtFKBP51 (vgl. Abb. 17 in Abschnitt 4.6). Es befand sich deutlich weniger MR im Nukleus bei Zellen, die die PPIase-Mutante von FKBP52 exprimierten als bei wtFKBP52 transfizierten Zellen (Abb. 19C). Die Verteilung des MRs ist also bereits vor Hormongabe deutlich verändert wie bereits vorher bei FKBP51 beobachtet wurde.

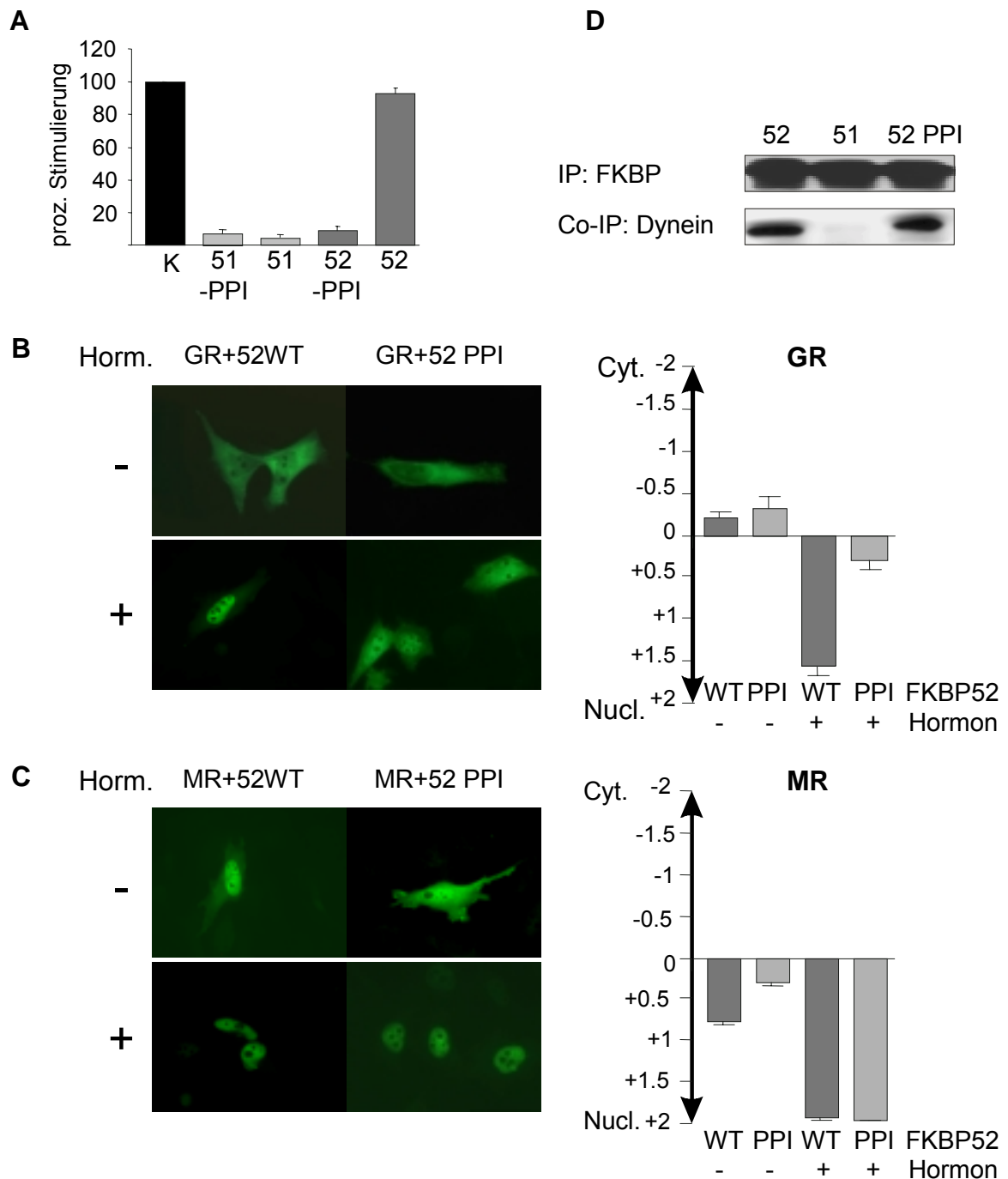


Abb. 19: Die PPlase Aktivität von FKBP52 ist für die Funktion des GRs und MRs notwendig

A: SK-N-MC Zellen wurden mit MTV-Luc, β -Gal-Plasmid, GR-Plasmid und je 3 μ g Konierungsvektor (K) bzw. eines Plasmids transfiziert, welches für den WT bzw. die PPlase-Mutante (FD67/68DV) des FKBP52s kodiert. Die Luciferase-Werte wurden mit den β -Galaktosidase-Werten normalisiert und die prozentuale Stimulierung berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten + SEM. **B und C:** HeLa Zellen wurden mit 0,25 μ g eines GFP-fusionierten GRs (B)

oder MRs (C) und 0,75µg des für das wtFKBP52 bzw. die PPlase-Mutante kodierenden Plasmids transfiziert. Die Zellen wurden 24Std in steroidfreiem Medium kultiviert und schließlich für 45min mit 10nM Cortisol inkubiert. Die Verteilung des GRs bzw. des MRs zwischen Zytosol (-2) und Nukleus (+2) wurde durch Auszählen von mehr als 100 Zellen quantitativ bestimmt. Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten + SEM dargestellt (rechte Seite von B und C). **D:** HEK Zellen wurden mit 10µg des wtFKBP52, des wtFKBP51 und des die PPlase-Mutante von FKBP52 exprimierenden Plasmids transfiziert. Nach 24Std. wurden die Zellen lysiert und die mit dem FLAG-Epitop fusionierten Immunophiline präzipitiert. Dargestellt ist das präzipitierte Immunophilin sowie das copräzipitierte Dynein.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der Verlust der PPlase-Aktivität FKBP51 in seiner Fähigkeit die GR-vermittelte Transaktivierung zu hemmen nicht beeinflußt, aber FKBP52 zu einem starken Inhibitor macht. Das mutierte FKBP52 zeigte in fast allen Experimenten ähnliche Resultate wie das Wildtyp-FKBP51 nur die Interaktion mit Dynein war unterschiedlich. An welchem Schritt der CR-Aktivierung die PPlase-Aktivität von FKBP52 notwendig ist, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sie kann entweder für die nukleäre Translokation und/oder die Bindungsaffinität von Bedeutung sein.

4.8 Unterschiede in der PPlase-Domäne von FKBP51 und FKBP52 führen zur unterschiedlichen Interaktion mit Dynein

Von den vier Domänen, in die sich die Immunophiline unterteilen lassen (Abb. 20A), wurde für die PPlase-Domäne von FKBP52 gezeigt, daß sie für die Dynein-Interaktion wichtig ist (Galigniana et al., 2002; Galigniana et al., 2001; Silverstein et al., 1999). Das heißt, obwohl die PPlase-Aktivität für die inhibitorische Funktion von FKBP51 nicht notwendig ist (Abb. 19A), könnte die PPlase-Domäne aufgrund ihrer Struktur für die differentielle Wirkung von FKBP51 und FKBP52 auf die GR-vermittelte Transaktivierung benötigt werden. Um dieses Problem zu lösen wurde der N-terminale Bereich zwischen FKBP51 und FKBP52 ausgetauscht und hinsichtlich seiner Funktion für den GR im Reporter-gen-Assay untersucht. Ein chimäres FKBP52, bei dem die PPlase-Domäne durch die von FKBP51 ersetzt wurde (Chimäres1, Abb. 20B), reduziert die GR-vermittelte Transaktivierung (Abb. 20C). Analog dazu führte der Austausch der PPlase-Domäne von FKBP51 durch die von FKBP52 (Chimäres2, Abb. 20B) zum Verlust der hemmenden Eigenschaft dieses Proteins (Abb. 20C). Beide Chimäre wurden im selben Maße exprimiert (Abb. 20D oben) und interagierten mit Hsp90 (Abb. 20D unten). Die Immunpräzipitation mit Dynein zeigte, wie erwartet, daß

Chimäres1 eine deutlich geringere Bindung an Dynein aufweist als Chimäres2 (Abb. 20D Mitte). Aufgrund dieser Beobachtung, kann man herleiten, daß die unterschiedliche Bindung der PPIase-Domänen von FKBP51 und FKBP52 an Dynein zu ihrer unterschiedlichen Wirkung auf den GR beiträgt.

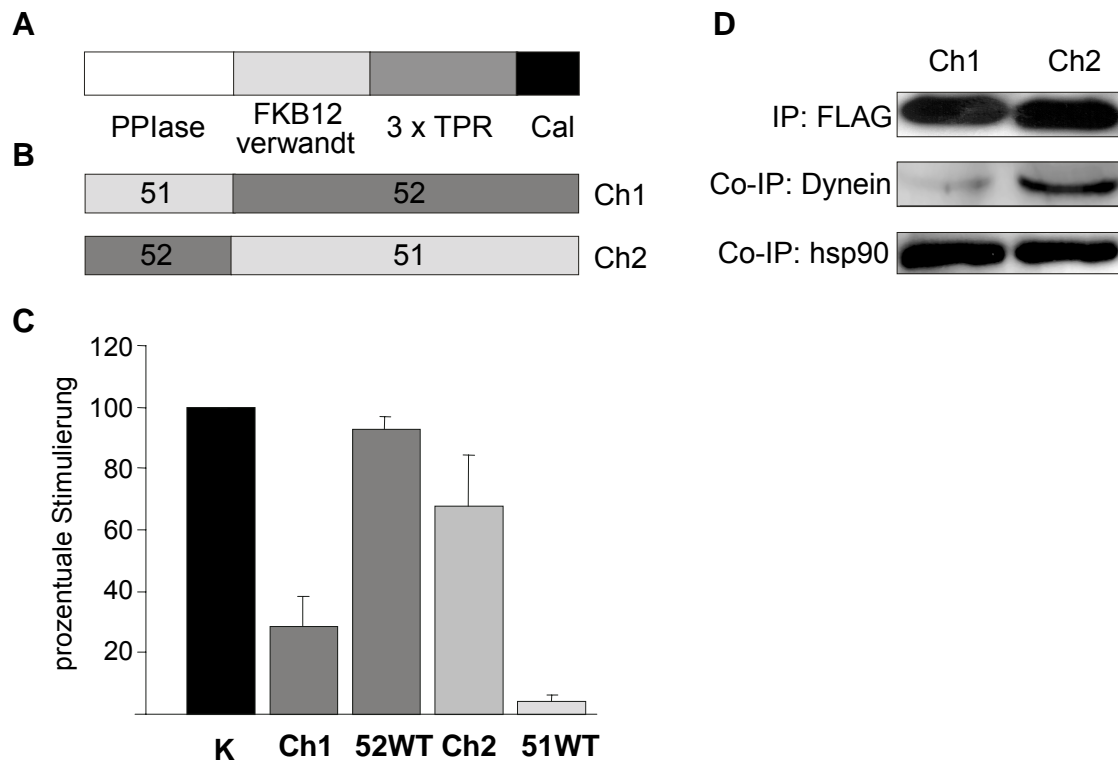


Abb.20: Die PPIase-Domäne von FKBP51 ist für die hemmende Funktion notwendig.

A: Domänenstruktur von FKBP51 und FKBP52. Weiß: PPIase-Domäne (Chambraud et al., 1993; Pirkl et al., 2001b) grau: zweite zu FKBP12 homologe Domäne (Callebaut et al., 1992; Chambraud et al., 1993; Pirkl et al., 2001b) dunkelgrau: TPR-Domäne (Radanyi et al., 1994) schwarz: Calmodulin-bindende Region (Massol et al., 1992) **B:** Struktur der hergestellten Chimären **C:** HEK Zellen wurden mit MTV-Luc, β -Gal, pRK7-GR und 3 μ g der angegebenen Chimären, WT-Immunophilin bzw. Konierungsvektor (K) transfiziert. Die prozentuale Stimulierung von drei gemittelten Experimenten + SEM ist dargestellt **D:** Coimmunopräzipitation der Chimären mit Hsp90 und Dynein. HEK Zellen wurden mit 10 μ g des jeweils angegebenen Plasmids transfiziert und für 24Std kultiviert.

Um zu untersuchen, ob auch andere Domänen der Immunophiline zur unterschiedlichen Beeinflussung der CR einen Beitrag leisten, wurden weitere Chimäre gebildet. So wurde z.B. die Calmodulinbindungsregion von FKBP51 durch die von FKBP52 ersetzt (Abb. 21A, Ch3). Dieses Protein hemmte die GR-vermittelte Transkription um 50% (Abb. 21B), aber mittels

Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, daß dieses Chimäre nicht mehr mit Hsp90 interagieren kann (Abb. 21C). In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit wurde belegt, daß unterschiedlich Teile von FKBP51 und FKBP52 neben der TPR-Domäne für die Wechselwirkung mit Hsp90 wichtig sind (Cheung-Flynn et al., 2003). Dieser Befund konnte durch zwei weitere Chimäre bestätigt werden. Das Chimäre Ch5 (Abb. 21A), bei welchem die TPR-Domäne von FKBP52 durch die von FKBP51 ersetzt wurde, ist nicht in der Lage, an Hsp90 zu binden (Abb. 21C). Dagegen führt der analoge Austausch der TPR-Domäne im FKBP51 durch die von FKBP52 beim Chimären Ch4 (Abb. 21A) zu keiner eingeschränkten Interaktion mit Hsp90 (Abb. 21C). Der Einfluß auf die GR-Aktivität war bei beiden Chimären ähnlich, wobei das Chimäre Ch4 zu einer 50% Hemmung des GRs führte und das Chimäre Ch5 nur in einer 30% Reduktion resultierte (Abb. 21B).

Diese Experimente zeigen, daß trotz der großen Homologie zwischen FKBP51 und FKBP52 erhebliche Unterschiede in der Bindung an Hsp90 und in ihrer Funktion bestehen. Es kann momentan nicht ausgeschlossen werden, daß neben der PPIase-Domäne weitere Regionen einen Einfluß auf die unterschiedliche Funktion der beiden Immunophilinen haben.

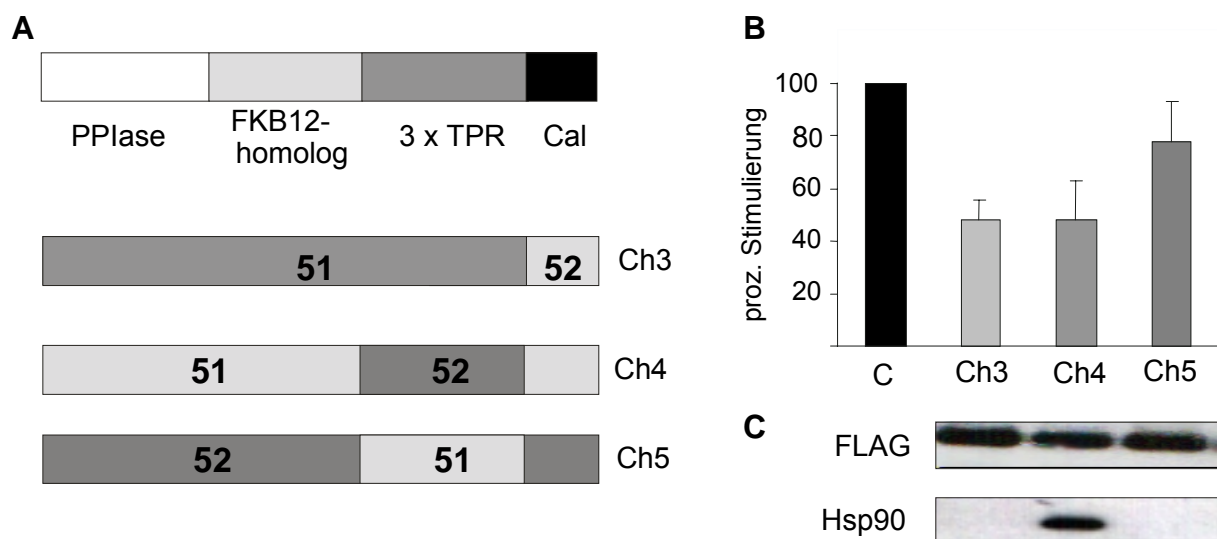


Abb. 21: Die TPR-Domäne allein ist nicht ausreichend für die Hsp90-Bindung

A: Domänenstruktur von FKBP51 und FKBP52 (Abb. 20A) und die Struktur der hergestellten Chimären **B:** SK-N-MC Zellen wurden mit MTV-Luc, β -Gal, pRK7-GR und 3 μ g des angegebenen Chimären oder Konierungsvektor (C) transfiziert. Die prozentuale Stimulierung von sechs gemittelten Experimenten + SEM ist dargestellt **C:** Coimmunopräzipitation der Chimären mit Hsp90. HEK-Zellen wurden mit 10 μ g des jeweils angegebenen Plasmids transfiziert und für 24Std inkubiert.

4.9 Ein N-terminales Fragment von FKBP52, aber nicht von FKBP51 beeinflusst die nukleäre Translokation des GRs

Es wurde gezeigt, daß ein N-terminales Fragment von FKBP52, welches die PPIase-Domäne umfaßt, die Interaktion mit Dynein behindert und zu einer Verzögerung der nukleären Translokation des GRs führt (Galigniana et al., 2002). Falls die PPIase-Domäne von FKBP51 nicht mit Dynein wechselwirken kann, sollte die Überexpression dieser Region keinen Einfluß auf die Translokation des GRs haben. Es konnte tatsächlich nur für das PPIase-Fragment von FKBP52, aber nicht das von FKBP51, eine Beeinflussung der nukleären Translokation nachgewiesen werden (Abb. 22A).

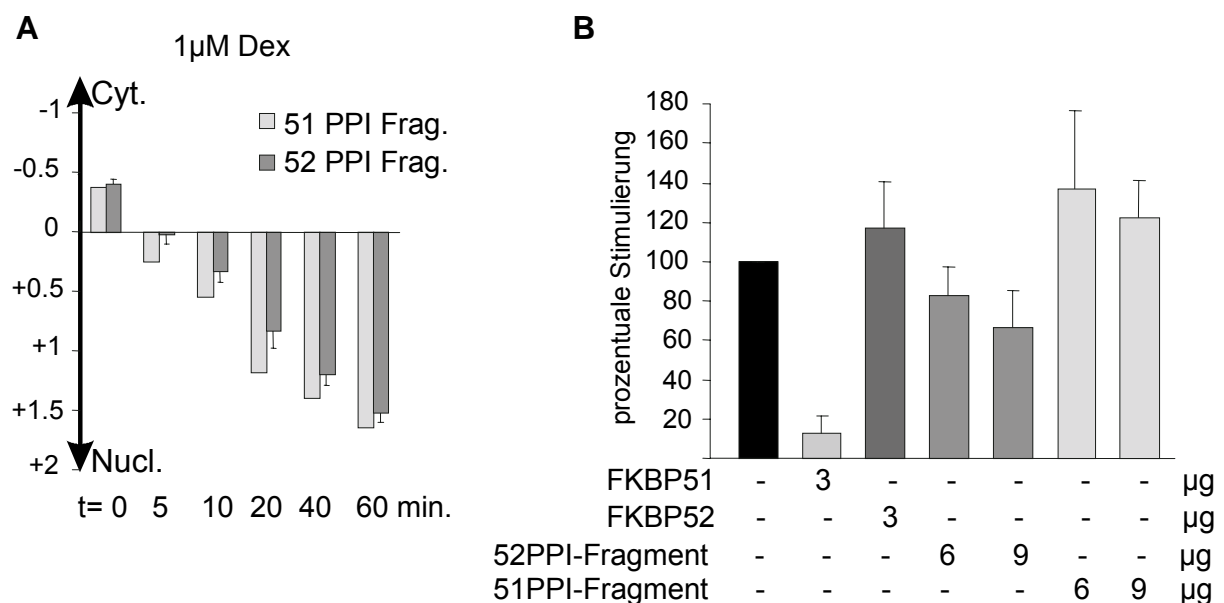


Abb. 22: Die PPIase Fragmente der beiden Immunophilinen beeinflussen die nukleäre Translokation des GRs unterschiedlich

A: HeLa-Zellen wurden mit 0,15µg GFP-GR-Plasmid und 1µg des jeweiligen PPIase-Fragments transfiziert. Nach 24Std wurden die Zellen mit kaltem Medium, welchem 1µM Dex zugefügt wurde, 1Std auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in den 37°C -Brutschrank transferiert und nach der angegebenen Zeit fixiert. Die Verteilung des Rezeptors zwischen Zytoplasma (-2) und Nukleus (+2) wurde durch Auszählen von mehr als 100 Zellen quantitativ bestimmt. Für jede Bedingung ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. **B:** HEK-Zellen wurden mit MTV-Luc, β-Gal, pRK7-GR und den angegebenen Plasmiden transfiziert. Luciferase-Daten wurden mit β-Galaktosidase normalisiert und die prozentuale Stimulierung berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten + SEM.

In diesem Experiment wurden Sättigungskonzentrationen an Hormon verwendet, um Effekte abzugreifen, die unabhängig sind von eventuellen Veränderungen der Bindungsaffinität (K_d). Beide Fragmente wurden auch im Luciferaseassay untersucht. Der Einfluß des PPlase-Fragments von FKBP52 auf die Transkription nach 16 Stunden war nur gering und entsprach dem Effekt, der mit FKBP51 bei gesättigten Hormonkonzentrationen beobachtet wurde (Abb. 22B), also bei Bedingungen, unter denen Veränderungen der K_d nicht beobachtbar sind. Insgesamt läßt sich aus diesen Experimenten ableiten, daß die PPlase-Domäne der beiden Immunophiline für die differentielle Interaktion mit Dynein und auch wesentlich für die differentielle Beeinflussung des GRs verantwortlich ist.

4.10 Korrelation zwischen Polymorphismen im Gen von FKBP51 und Ansprechen auf Antidepressiva

Die Therapiemöglichkeiten bei einer depressiven Erkrankung sind heutzutage durch die lange Therapiedauer, die große Zahl an therapieresistenten Patienten und den zum Teil erheblichen Nebenwirkungen der verwendeten Antidepressiva noch nicht zufriedenstellend. Die Tatsache, daß es bei der Besserung von Symptomen auch zu einer Normalisierung der HPA-Achse kommt, läßt vermuten, daß Gene, die die HPA-Achsen-Aktivität beeinflussen, für die Antidepressivabehandlung wichtig sind.

Das sogenannte M.A.R.S. (Munich-Antidepressant-Response-Signature) Projekt untersucht u.a. diese These. In einem Teil dieser Studie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie wird versucht, durch Genotypisierung Korrelationen mit dem Therapieerfolg bzw. mit dem Erkrankungsrisiko und Genen zu finden, die die Aktivität der HPA-Achse regulieren. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die single nucleotide Polymorphismen (SNPs) von acht für die HPA-Funktion relevanten Genen untersucht. Diese Gene waren neben dem GR selbst auch dessen Cofaktoren, insbesondere Chaperone. Die Ergebnisse zeigten, daß SNPs im Gen von FKBP51 stark mit dem Behandlungserfolg der Antidepressiva-Medikation assoziiert sind. Patienten, die homozygot für das C Allel des SNPs in Intron1 (rs3800372) sind, zeigten ein schnelleres Ansprechen auf eine Antidepressivabehandlung als die beiden anderen Allelkombinationen (TT homozygot und CT heterozygot). Während bei den anderen beiden Patientengruppen erst fünf Wochen nach Beginn der Medikation eine Besserung der Symptome zu beobachten war, zeigten die CC-homozygoten Patienten bereits nach der zweiten Woche eine deutliche Besserung. Außerdem stellte man bei dieser Patientengruppe auch mehr als doppelt so viele depressive Vorerkrankungen fest. Daraus läßt sich schließen, daß trotz des schnelleren Therapieerfolges das Risiko einer erneuten Erkrankung bei den CC-Homozygoten erhöht zu sein scheint.

Da der SNP mit der stärksten Korrelation im Intron1 des FKBP51-Gens lokalisiert ist, war es wichtig zu testen, ob die funktionelle Korrelation der Genotypen sich auch in molekularen Ereignissen widerspiegelt. Hierzu wurden Lymphozythen aus dem Blut mittels magnetischer Partikel isoliert, an die CD-2 Antikörper gekoppelt waren. Zur Lyse wurde derselbe Puffer verwendet, der bereits für die Immunpräzipitationen genutzt wurde. Um einen Proteinabbau zu verhindern, wurden Protease-Inhibitoren zugesetzt und auf Eis gearbeitet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinmenge von FKBP51 in den isolierten Lymphozyten bestimmt. Interessanterweise ergab die Analyse, daß auch die FKBP51-Menge gegenüber den anderen Genotypen deutlich erhöht war (Abb. 23). Dieses Ergebnis zeigt, daß sich die funktionelle Korrelation der Genotypen auch auf der Proteinebene widerspiegelt. Der genaue Mechanismus für die Erhöhung der Proteinmenge von FKBP51 bei Vorliegen des SNPs in Intron 1 ist aber noch nicht bekannt (vgl. Diskussion Abschnitt 5.2).

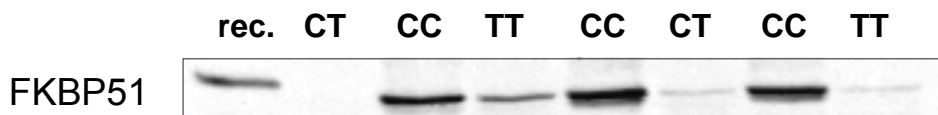


Abb. 23: Quantitativer Western-Blot. 20µg Gesamtprotein der Lymphozytenextrakte wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit dem FKBP51-Antikörper (Stress Gen) detektiert. Als Referenz wurden 25ng des gereinigten, rekombinanten FKBP51-Protein (rec.), welches an ein FLAG-Epitop fusioniert ist, aufgetragen. Die entsprechenden Genotypen der Proben sind angegeben.

4.11 p23 hemmt die GR-Aktivität

Neben den Immunophilinen wurde auch der Effekt von p23 untersucht, dem kleinen aciden Protein, welches an Hsp90 bindet. Es wurde derselbe Reporterassay wie auch bei den Immunophilinen verwendet. Es stellte sich heraus, daß Überexpression von p23 die durch den GR ausgelöste Hormonantwort hemmte (Abb. 24A). Da in einer Publikation eine Stimulierung des GRs durch p23 berichtet wurde (Freeman et al., 2000), war es notwendig, diesen Befund auch in anderen Zelllinien zu testen. Die Inhibierung konnte in der Tat in HeLa, HEK und Sk-N-MC Zellen bestätigt werden. Da die GR-Mengen bei allen Bedingungen gleich waren (Abb. 24B), kann die beobachtete Hemmung nicht durch Abbau des Rezeptors erklärt werden. Das FLAG-fusionierte Protein und das Wildtyp-p23 zeigten keine Unterschiede in ihrer Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Um die Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung auf den GR von der Hormonkonzentration zu testen, wurde diese zwischen 0 und 1000 nM variiert. Der inhibitorische Effekt war bei

höheren Hormonkonzentration zum Teil wieder aufgehoben (Abb. 24E), d.h. die hemmende Funktion ist bei moderaten Konzentration am ausgeprägtesten. Dies könnte mit einem Zerfall der Hsp90-Heterokomplexe erklärt werden, der möglicherweise durch p23 induziert wird. Um dies zu testen, wurde ein GR, der an das FLAG Epitop fusioniert war, präzipitiert und seine Bindung an Hsp90 untersucht. Die copräzipitierte Menge an Hsp90 war mit und ohne cotransfiziertem p23 gleich (Abb. 24D), so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Überexpression von p23 zu keinem Zerfall der zytosolischen Hsp90-GR-Heterokomplexe führt.

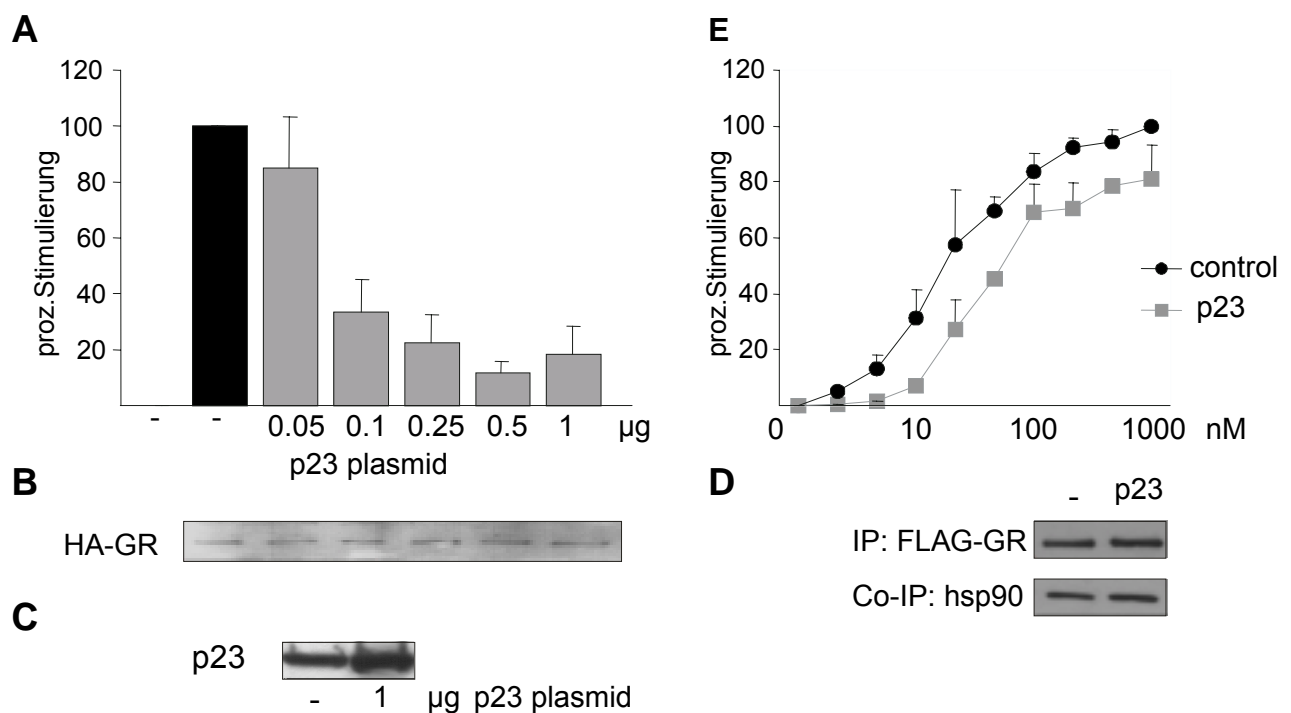


Abb. 24: p23 reduziert die GR-abhängige Transkription

SK-N-MC Zellen wurden mit dem Reporterplasmid MTV-Luc, einem GR-exprimierenden Plasmid, einem β -Galaktosidase-Plasmid und ansteigenden Mengen eines p23-Expressionsplasmids transfiziert. Die Zellen wurden nach 16stündiger Behandlung mit 10nM Cortisol lysiert. **A:** Die Luciferase-Aktivität wurde mit den β -Galaktosidase-Werten normalisiert und die prozentuale Stimulierung berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten + SEM **B:** Repräsentativer Western-Blot mit HA-fusioniertem GR. **C:** Western-Blot zur Kontrolle der Überexpression von p23 durch Vergleich der endogenen Menge von p23 mit der Menge nach Transfektion von 1µg p23-Expressionsplasmid. **D:** Effekt von p23 (1µg Plasmid) bei unterschiedlichen Konzentrationen von Cortisol **E:** HEK-Zellen wurden mit FLAG-fusioniertem GR (1µg) und Kontrollvektor bzw. p23-Expressionsplasmid (3µg) transfiziert. Nach Detektion von Hsp90 wurde die Membran gestrippt und anschließend mit FLAG-Antikörper behandelt.

In einer früheren Studie wurde berichtet, daß Überexpression von p23 zu einer Erhöhung der GR-vermittelten Transaktivierung in HeLa-Zellen führte (Freeman et al., 2000). Es war zu prüfen, ob der in der vorliegenden Arbeit beschriebene hemmende Effekt von p23 erst bei hoher Überexpression auftritt und die berichtete stimulierende Wirkung (Freeman et al., 2000) bei sehr geringen Mengen von p23. Hierzu wurde ein induzierbares System etabliert, das eine feine Titration der p23-Mengen erlaubt, die in dem bisher verwendeten System nicht möglich war. Es wurde das TReX-System von Invitrogen (Karlsruhe) gewählt. In diesem Vektor wird die Expression eines Gens, in diesem Fall p23, durch Bindung eines Repressors an den Promotor verhindert. Erst die Behandlung der Zellen mit Tetracyclin löst den Repressor von dem Promotor ab und die Transkription kann erfolgen. Für diese Versuche wurden HeLa-Zellen verwendet, die stabil den Tetracyclinrepressor exprimieren. Mittels eines induzierbaren β -Galaktosidase Plasmids konnte die Induktion durch Tetracyclin gut verfolgt werden. Auch in diesem System zeigte sich, daß p23 auch bei geringer Induktion die GR-abhängige Transaktivierung hemmte (Daten nicht gezeigt).

4.12 Identifikation von Aminosäuren in p23, die für die Hsp90-Bindung notwendig sind

Es ist bekannt, daß p23 als Cochaperone von Hsp90 wirkt (Johnson et al., 1994) aber es wird ihm auch eigene Chaperonaktivität zugeschrieben (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996). Aus diesem Grund war es wichtig zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt von p23 auf den GR über seine Bindung an Hsp90 oder seine eigene Chaperonaktivität vermittelt wird. Dazu war es nötig, diese beiden Eigenschaften voneinander zu trennen. Es war bekannt, daß ein p23-Protein mit einer Deletion des C-Terminus im Vergleich zum Wildtyp-Protein keine Chaperonaktivität mehr besitzt, aber weiterhin an Hsp90 bindet und auch in seiner Cochaperon-Funktion nicht beeinträchtigt ist (Weikl et al., 1999; Weaver et al., 2000). Es konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, daß ein p23, welchem 35 C-terminale Aminosäuren fehlen, noch mit Hsp90 interagiert (Abb. 25A und 25B).

Um gezielt die Cochaperon-Funktion zu untersuchen, wurden Mutanten etabliert, die nicht mehr an Hsp90 binden können. Wichtige Hinweise lieferte dabei die Kristallstruktur von p23 (Weaver et al., 2000) und die Identifikation von konservierten Bereichen im Protein. Zuerst wurde versucht den am stärksten konservierten Bereich zwischen Aminosäure 86 und 108 zu deletieren. Das so entstandene Protein erwies sich als instabil, so daß nach Punktmutationen gesucht wurde, die möglicherweise die Hsp90-Wechselwirkung beeinflussen. Anhand der p23-Kristallstruktur wurde festgestellt, daß die zwei hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin (Position 103) und Tryptophan (Position 106) an der Oberfläche

des Proteins exponiert sind. Die Mutation dieser beiden Aminosäuren zu Alanin (F103A/W106A, "ANNA" Abb. 25A) hob die Hsp90-Bindung auf (Abb. 25B). Dabei schienen beide AS von Bedeutung zu sein, weil die Mutation von jeweils einer der oben erwähnten AS (F103A, W106A Abb. 25A) bereits zu einem Verlust der Hsp90-Interaktion führte (Abb. 25B). Prüfte man diese Mutanten bezüglich ihres Effektes auf die GR-vermittelte Transaktivierung, stellte man fest, daß alle Mutanten, die nicht an Hsp90 binden konnten, auch nicht die transkriptionelle Aktivität des GRs unterdrückten (Abb. 25C). Im Gegensatz dazu inhibierte die hsp90-bindende C-terminale Deletionsmutante C35 (Abb. 25A,B), die in ihrer Chaperonaktivität beeinträchtigt ist (Weaver et al., 2000; Weikl et al., 1999), die Aktivität des GR genauso effektiv wie der WT (Abb. 25C).

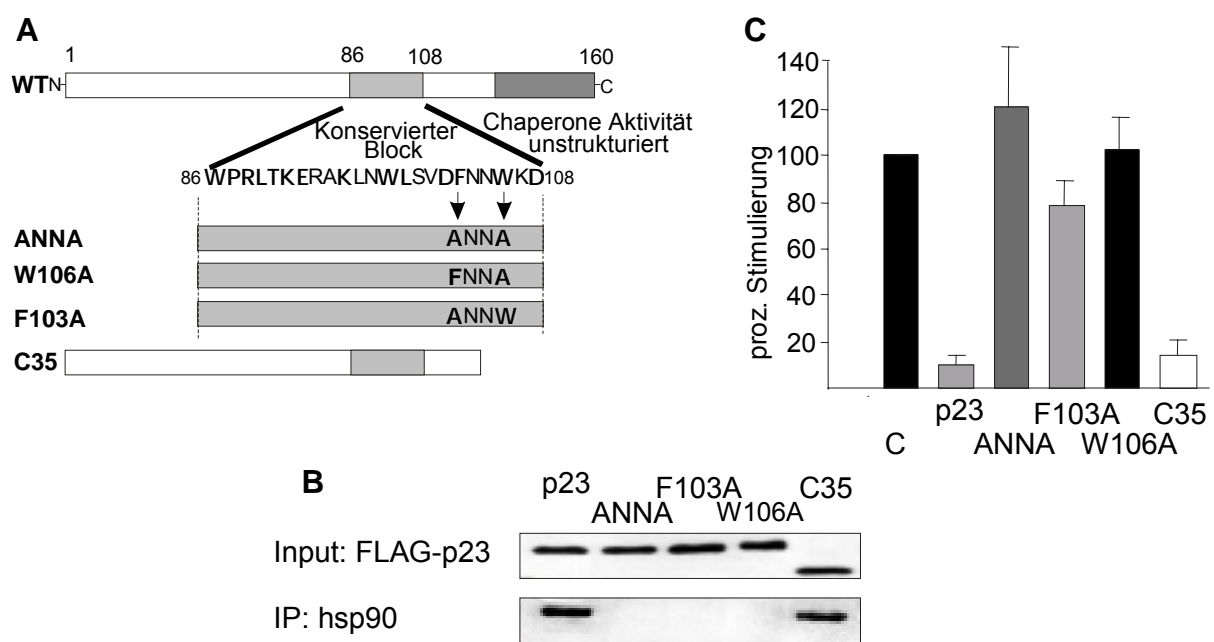


Abb.25: Die Hsp90-Interaktion, nicht aber der C-terminale Bereich von p23, ist für seine hemmende Funktion auf den GR notwendig

A: Struktur von WTp23 und Mutanten. Hellgrau: Region mit der höchsten Konservierung (Weaver et al., 2000). Konservierte AS sind fettgedruckt. Dunkelgrau: Unstrukturierter C-Terminus mit Chaperonaktivität (Weaver et al., 2000; Weikl et al., 1999) **B:** Immunpräzipitation der mit einem FLAG-Epitop fusionierten p23-Proteine. Oben: Western-Blot, mit FLAG-Antikörper behandelt zur Kontrolle der Proteinexpression. Unten: Western-Blot, mit Hsp90-Antikörper behandelt nach FLAG-Immunpräzipitation **C:** SK-N-MC Zellen wurden mit Reporterplasmid, GR-Expressionsplasmid, β -Galaktosidase-Plasmid und 3 μ g des Klonierungsvektors (C) bzw. des angegebenen p23-Expressionsplasmid transfiziert. Die prozentuale Stimulierung wurde berechnet und als Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten + SEM dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Hsp90-abhängige Cochaperon-Funktion von p23 für die hemmende Wirkung auf den GR nötig ist, und nicht die eigene Chaperonaktivität.

4.13 p23 reduziert Hsp90-abhängig die Aktivität eines konstitutiv nukleären GRs

Lange Zeit ging man davon aus, daß p23 beim Faltungsprozess der Steroidrezeptoren im Zytosol beteiligt ist (Pratt und Toft, 1997). Vor kurzem ist von einer nukleären Rolle von p23 berichtet worden (Freeman und Yamamoto, 2002). Es wurde gezeigt, daß p23 zur Ablösung transkriptionell regulatorischer Komplexe von der DNA führt. Im Hinblick auf eine nukleäre Funktion von p23 wurde die Lokalisation dieses Proteins in der Zelle untersucht. Ein GFP-fusioniertes p23 liegt in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt vor (Abb. 26D), so daß eine Wirkung im Kern durchaus plausibel ist. Um dies zu bestätigen, wurde der Effekt von p23 auf einen konstitutiv aktiven GR untersucht. Dieser trunkierte GR (AS 1-515) besitzt keine LBD, so daß er ohne Hormonbindung die Transkription aktivieren kann, wenn auch im geringeren Ausmaß wie der Wildtyp-GR. Zuerst wurde die Lokalisation dieses Rezeptors überprüft. Wie erwartet ist ein GFP-fusionierter, trunkierter GR (AS 1-515) im Gegensatz zum Wildtyp-GR ohne Hormon bereits im Zellkern lokalisiert (Abb. 26C).

Wurde dieser GR im Reporter-gen-Assay eingesetzt, stellte man fest, daß p23 auch in diesem Fall hemmend wirkt. Somit konnte der nukleäre Effekt von p23 bestätigt werden. Da Hsp90, wie berichtet wurde, im Kern ähnliche Wirkungen besitzt wie p23 (Freeman und Yamamoto, 2002), ist nicht klar, ob p23 auch in diesem Fall als Cochaperon von Hsp90 wirkt. Um diese Frage zu klären, wurden die p23-Mutanten, die nicht mehr mit Hsp90 interagieren, auf ihre Funktion bezüglich des konstitutiv aktiven GRs hin untersucht. Es zeigte sich, daß auch dieser Effekt von p23 abhängig war von Hsp90, weil die Mutante "ANNA" (F103A/W106A, Abb. 25A), die keine Interaktion mit Hsp90 zeigte, den konstitutiv nukleären GR nicht inhibierte (Abb. 26A), während das C-terminal trunkierte p23 (C35) weiterhin hemmend wirkte. Auch dieser Rezeptor wurde in seiner Expression oder seinem Abbau nicht von p23 beeinflusst (Abb. 26B). Die relative Inhibierung durch p23, die hier gemessen wurde erscheint kleiner als für den Wildtyp-GR, allerdings kann die mit der bereits niedrigeren Gesamtaktivität des trunkierten GR erklärt werden. Möglicherweise benötigt auch die stärkere Expression dieses GRs entsprechend höhere Mengen an p23, um einen vergleichbaren Effekt hervorzurufen.

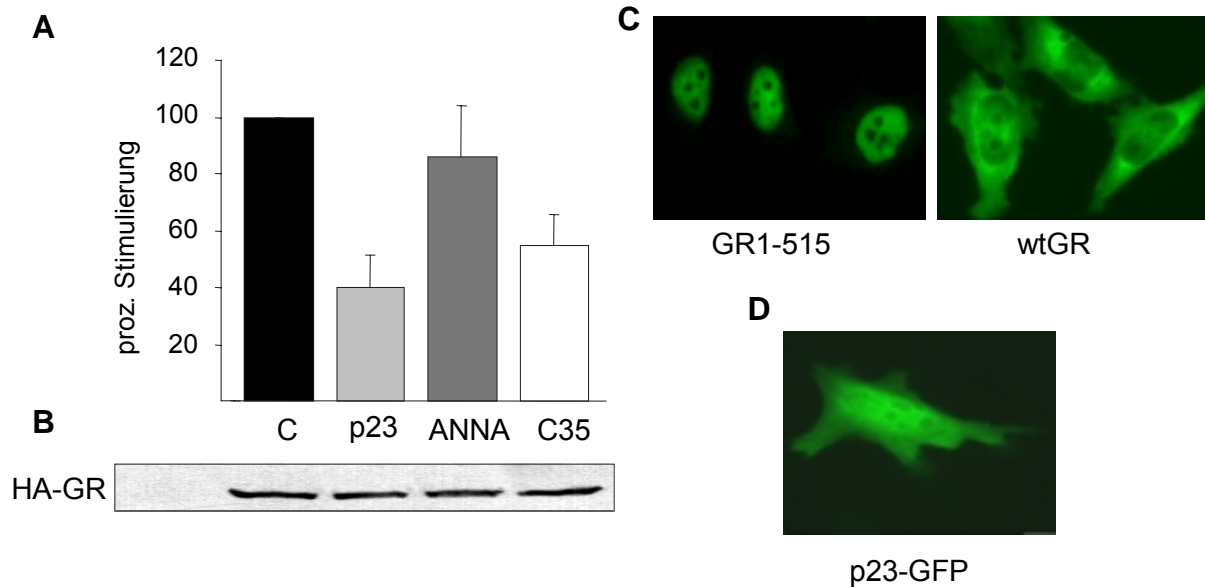


Abb. 26: Auch die Hemmung eines konstitutiv aktiven GRs durch p23 ist von Hsp90 abhängig

A: SK-N-MC Zellen wurden mit dem Reporterplasmid, einem β -Galaktosidase-Plasmid, 1 μ g eines Plasmids, welches für eine trunkierte Variante des GRs kodiert, und 3 μ g Klonierungsvektor bzw. p23-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 16Std wurden die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Aus den mit β -Galaktosidase normalisierten Luciferase-Werten von Zellen mit bzw. ohne konstitutiv aktiven GR wurde die prozentuale Stimulierung berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus 15 unabhängigen Experimenten für Wildtyp-p23, 14 für die ANNA-Mutante und 8 für die C-35 Mutante + SEM. **B:** Repräsentativer Western-Blot des HA-fusionierten konstitutiv aktiven GRs. **C:** Repräsentative Aufnahme eines GFP-fusionierten konstitutiv aktiven GRs und des Wildtyp-GRs in HeLa-Zellen. **D:** Repräsentative Aufnahme des GFP-fusionierten Wildtyp-p23 in HeLa-Zellen.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß p23 als Cochaperon von Hsp90 auf den GR wirkt und die eigene Chaperonaktivität für die Hemmung nicht von Bedeutung ist. Momentan ist noch nicht klar, bei welchen zellulären Funktionen p23 als eigenständiges Chaperon wirkt.

Nur im Widerstreit gegensätzlicher
Meinungen wird die Wahrheit entdeckt
und an den Tag gebracht.

Claude Adrien Helvetius

5. Diskussion

5.1 Die Rolle von FKBP51 und FKBP52 im Hsp90-Heterokomplex

Glucocorticoide sind in vielen lebenswichtigen Prozessen beteiligt und werden aufgrund ihrer starken immunsuppressiven und entzündungshemmenden Wirkung zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen eingesetzt (Boumpas et al., 1993; Barnes, 1998). Eine Veränderung der Gewebesensitivität gegenüber Corticoiden hat zum einen Einfluss auf den Therapieerfolg und ist zum anderen mit einer Reihe pathologischer Symptome assoziiert (Kino und Chrousos, 2002). So stellt man z.B. bei Patienten mit einer depressiven Erkrankung häufig eine Glucocorticoid-Resistenz fest (Holsboer, 2000). Bei der Suche nach Erklärungsmodellen für solche Resistenzen konzentriert man sich vor allem auf die beiden Corticoidrezeptoren GR und MR (Brönnegård et al., 1996; Kino und Chrousos, 2001; Zennaro, 1998). Da bisher bei den meisten affektiven Erkrankungen keine Mutationen im Gen des GR identifiziert wurden (Huizenga et al., 2000; Koper et al., 1997; Moutsatsou et al., 2000), müssen auch Veränderungen bei den mit den Rezeptoren assoziierten Cofaktoren als Erklärungsmöglichkeit in Betracht gezogen werden.

Die Untersuchung von Primaten der Neuen Welt zeigte, daß diese Tiere ein natürliches Modell für eine Glucocorticoid-Resistenz darstellen (Chrousos et al., 1986). Die bei diesen Affen beobachtete reduzierte Hormonbindungsaffinität des GR kann durch die erhöhte Expression des Immunophilins FKBP51 erklärt werden. Die Menge des homologen FKBP52 hingegen ist in diesen Affen im Vergleich zu humanen Lymphozyten reduziert (Scammell et al., 2001; Denny et al., 2000; Reynolds et al., 1999). Überexpression von humanem FKBP51 in Cos-1 Zellen zeigte, daß auch humanes FKBP51 die GR-vermittelte Transkription inhibiert, wenn auch in einem geringeren Maß als das Immunophilin der Totenkopffaffen (Denny et al., 2000). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit in drei weiteren Zelllinien bestätigt werden und es konnte nachgewiesen werden, daß die Immunophiline über den Hsp90-Heterokomplex auf die Aktivität des GRs wirken. Andere Substratproteine von Hsp90 wie PR, AR, ER und HSF-1 werden allerdings von FKBP51 nicht beeinflusst, so daß FKBP51 spezifisch nur die Corticoidrezeptoren hemmt. Momentan kann zwar eine Funktion auf andere Hsp90-Substrate noch nicht ausgeschlossen werden, es zeichnet sich

aber bereits ab, daß die Rolle von FKBP51 stärker spezialisiert zu sein scheint, als z.B. von Hsp90, p23 oder src1, die zusätzlich zu den Corticoidrezeptoren eine Vielzahl anderer Proteine beeinflussen (Freeman et al., 2000; Leo und Chen, 2000; Buchner, 1999). Vor kurzem wurde von einer anderen Gruppe ein hemmender Effekt von FKBP51 auf den PR berichtet (Hubler et al., 2003). Der Grund für den Unterschied zu dem Resultat dieser Arbeit ist nicht bekannt, allerdings wurden in der erwähnten Publikation sehr große Mengen an Plasmid für die Transfektionen eingesetzt. Es ist bekannt, daß die Aktivität von nukleären Rezeptoren durch die Transfektion von zu hohen Plasmidmengen beeinflusst werden kann (Hofman et al., 2000). Außerdem wurde das Expressionsniveau von FKBP51 nicht überprüft (Hubler et al., 2003) und es wurde eine andere Zelllinie und ein anderer Ligand als in dieser Arbeit verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß FKBP51 auf zwei verschiedenen Stufen in die Signaltransduktion von GR und MR eingreift: zum einen durch eine Reduktion der Hormonbindung, was aus der Titrationskurve ersichtlich wird und bereits zuvor gezeigt wurde (Denny et al., 2000), zum anderen durch eine Verlangsamung der nukleären Translokation, die durch eine verminderte Bindung an das Motorprotein Dynein erklärt werden kann. Die geringen Unterschiede in der PPlase-Domäne zwischen FKBP51 und FKBP52 scheinen ausreichend zu sein, um eine differentielle Dyneinbindung zu bewirken. Dies kann zum Teil die unterschiedlichen Effekte der homologen Immunophilinen FKBP51 und FKBP52 auf den GR und den MR in humanen Zellen erklären. Die Veränderung der Rezeptorverteilung, die durch die erhöhte Menge an FKBP51 hervorgerufen wird, zeigt sich auch in einer reduzierten nukleären Lokalisation des unaktivierten MRs.

Da die Bindung an Hsp90 absolut notwendig für die beobachtete Hemmung auf den GR ist, bestimmt offenbar der kompetitive Zugang der Immunophilinen zum GR-Heterokomplex die Aktivität des Rezeptors. Die Beobachtung, daß zunehmende Mengen an FKBP52 den hemmenden Effekt von FKBP51 aufheben können, bestätigt diese Hypothese.

Wird FKBP52 in den Komplex eingebaut, so kann auch mehr Dynein assoziieren. Neben der Dynein-Bindung ist zusätzlich auch die PPlase-Funktion von FKBP52 für eine effektive Signaltransduktion des GRs und des MRs von Bedeutung. Momentan ist nicht bekannt, für welche Funktion die PPlase-Aktivität von FKBP52 notwendig ist. Einerseits könnte sie für die Verbesserung der Hormonbindung benötigt werden, andererseits eine Rolle beim nukleären Transport spielen, oder in beide Prozesse involviert sein. Analog zur PPlase-Mutante von FKBP52 verhält sich PP5 (Protein Phosphatase5). Auch für PP5 wurde eine Dynein-Interaktion nachgewiesen (Galigniana et al., 2002), aber es wurde von keiner PPlase-Aktivität berichtet. Somit ist PP5, analog zur PPlase-Mutante von FKBP52, ein Inhibitor der GR-Funktion in Säugetierzellen. Auf der anderen Seite scheint die PPlase-Aktivität von FKBP51 keinen aktiven Beitrag zur Hemmung zu leisten, denn die Mutation der PPlase-

Aktivität von FKBP51 verändert dessen Funktion nicht. Es kann spekuliert werden, daß aufgrund geringer konformativer Unterschiede die PPlase-Domäne von FKBP51 nicht den Zugang zu den Prolylbindungen findet, die FKBP52 isomerisiert (Riggs et al., 2003). Leider ist momentan noch nicht bekannt um welche Prolylbindungen es sich dabei handelt bzw. in welchem Interaktionspartner von FKBP52 diese Isomerisierung stattfindet.

Viele Studien untersuchten die Bedeutung der PPlase-Aktivität der Immunophiline für ihre Funktion in der Steroid-Signaltransduktion durch Hemmung der PPlase mittels Immunsuppressiva-Behandlung. Die Interpretation dieser Daten ist insofern nicht eindeutig, als berichtet wurde, daß die intrazelluläre Konzentration von Dexamethason durch FK506 erhöht werden kann (Ning und Sanchez, 1993; Hutchison et al., 1993; Le Bihan et al., 1998; Kralli und Yamamoto, 1996). Diese Erhöhung funktioniert wahrscheinlich durch Blockierung des P-Glycoproteins durch FK506, sodaß es weniger Dexamethason aus der Zelle transportieren kann. Auch in dieser Arbeit wurde zuerst versucht, die Notwendigkeit der PPlase-Funktion mittels FK506 zu untersuchen. Dabei wurde kein signifikanter Effekt gefunden. Da berichtet wurde, daß FK506-gebundenes FKBP51 nicht in den Heterokomplex eingebaut werden kann (Smith et al., 1993), wurde eine Erhöhung der GR-vermittelten Transaktivierung erwartet. Zudem ergab die Behandlung der zytosolischen Extrakte der Lymphozyten von Totenkopffäffchen mit FK506 eine Erhöhung der Hormonbindung des GRs (Denny et al., 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das hier verwendete zelluläre System für diese Experimente nicht geeignet ist, vor allem weil die intrazelluläre Konzentration von FK506 nicht bekannt war. Deshalb war es sinnvoller, die Funktion der PPlase-Aktivität durch Punktmutationen zu untersuchen.

Die Effekte von FKBP51 und FKBP52 in Säugetierzellen, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, stehen auf den ersten Blick im Gegensatz zu den in Hefe beschriebenen Befunden (Riggs et al., 2003). Während die Überexpression von FKBP52 in Hefe zu einer Erhöhung der GR-abhängigen Transkription führte, zeigte dies in Säugetierzellen keinen Einfluss. Auf der anderen Seite bewirkte die Überexpression von FKBP51 in Säugetierzellen eine Hemmung des GRs, zeigte aber keinen Effekt in Hefe. Dieser vermeintliche Unterschied kann durch den verschiedenen zellulären Hintergrund, den die beiden Systeme bezüglich der Steroid-Signaltransduktion besitzen, erklärt werden. Im Laufe der Evolution haben sich die Steroide als Signaltransduktoren nur in höheren Eukaryonten entwickelt, und somit sind Säugetierzellen das geeignetste System für derartige Experimente. In Hefen fehlen jegliche Steroidrezeptoren und damit auch die notwendigen Regulatoren, so daß nur eine geringe, basale GR-Aktivität messbar ist. Alle Faktoren, die die GR-Aktivität fördern, wie z.B. FKBP52 können leicht in Hefe identifiziert werden. Diese Faktoren werden aber im bereits optimierten Säugetiersystem keinen Effekt zeigen. Genauso werden Faktoren, wie FKBP51 oder PP5, die die GR-Aktivität nicht unterstützen, nur im optimierten System wirken. Trotz dieses

Unterschiedes wurde die Bedeutung der Hsp90-Interaktion und der PPlase-Aktivität von FKBP52, die in dieser Arbeit für humane Zellen beschrieben wurden, in Hefe bestätigt (Riggs et al., 2003).

Zusammenfassend aus allen Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, daß von Seiten der Immunophilinkomponente des Heterokomplexes drei Eigenschaften für eine GR-vermittelte Transaktivierung wichtig sind: 1. Die Interaktion mit Hsp90, 2. die Wechselwirkung mit Dynein, und 3. die PPlase-Aktivität. Die Interaktion mit Hsp90 ist notwendig, um überhaupt einen Zugang zum Heterokomplex zu ermöglichen. Fehlt dem im Heterokomplex befindlichen Immunophilin eine der beiden anderen Eigenschaften, so ist die Signaltransduktion beeinträchtigt (vgl.Tab. 5.1).

Immunophilin	52	51	51/52 (Ch1)	52/51 (Ch2)	51PPlase Mut	52PPlase Mut
Dynein Assoz.	+	-	-	+	(-)	+
Translokation	+	-	(-)	(+)	(-)	-
Transaktivierung	+	-	-	+	-	-

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit ermittelten Effekte von FKBP51/FKBP52 auf die Aktivität der CR

Dargestellt sind die Effekte auf den unaktivierten MR und auf den GR bei ungesättigten Cortisol-Konzentrationen. Nur Proteine mit einer intakten TPR-Domäne sind in der Lage, in den Heterokomplex eingebaut zu werden. Ch1 und Ch2 sind die Chimäre mit ausgetauschter PPlase-Domäne (vgl. Kapitel 4.8). Vorhergesagte Effekte sind in Klammern dargestellt.

Auch in Hefe wurde versucht die Bedeutung der Dynein-Wechselwirkung zu untersuchen. Allerdings zeigte ein Hefestamm ohne Dynein dieselbe GR-Aktivität wie der entsprechende Wildtyp-Stamm (Riggs et al., 2003). Es ist nicht klar, ob dies einen weiteren Unterschied der beiden Systeme darstellt oder ob der Effekt der Dynein-Interaktion unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachweisbar war. So wurde z.B. die nukleäre Translokation in Hefen nicht untersucht und es wurde auch nicht geklärt, ob humanes FKBP52 an das Dynein der Hefe binden kann (Riggs et al., 2003). Vergleicht man die Effekte, die Deletionsmutanten der Immunophiline in höheren Eukaryonten und in Hefen zeigen, wird klar, daß diesen Proteinen in höheren Lebewesen eine größere Bedeutung zukommt. So zeigt z.B. eine Maus mit FKBP12-Deletion schwere, teils letale Störungen des Herzmuskels (Shou et al., 1998). Die Deletion aller Immunophiline in Hefe resultiert nur in einem geringfügig langsameren Wachstum (Dolinski et al., 1997). Insgesamt ist die Rolle der

verschiedenen PPlasen in höheren Eukaryonten facettenreicher und spezialisierter als in Hefen. Die Hefe bleibt für viele Untersuchungen ein bedeutsames experimentelles System, doch können wahrscheinlich nicht alle Aspekte des Steroid-Signalweges abgegriffen werden. Vor kurzem wurde ein Austausch von FKBP51 durch FKBP52 im GR-Heterokomplex nach Hormonbindung berichtet (Davies et al., 2002). Erhöhte Mengen an FKBP51, wie sie in dieser Studie eingesetzt wurden oder auch bei den Totenkopffäffchen zu finden sind (Reynolds et al., 1999), könnten einen solchen Austausch unterdrücken.

Welche Signifikanz hat die unterschiedliche Dynein-Interaktion der beiden Immunophiline für die Glucocorticoid-Signaltransduktion in höheren Eukaryonten? Die eingeschränkte Dynein-Bindung des GR-Heterokomplexes bei Überexpression von FKBP51 bewirkt offenbar einen verlangsamten nukleären Transport. Dieser Effekt kann unter Stressbedingungen durchaus eine signifikante Funktion ausüben. Es wurde berichtet, daß nach akutem Stress die Konzentration von Corticosteron bei Ratten bereits nach 30min ein Maximum erreicht und nach einer Stunde fast wieder auf basale Konzentrationen gesunken ist (Paskitti et al., 2000). Da die Stressantwort bei akutem Stress sehr schnell verläuft, kann ein inhibitorischer Effekt von FKBP51 auf die Kernlokalisierung von besonderer Bedeutung sein, da bei hohen Konzentrationen von Cortisol unter Stress der Effekt auf die Hormonbindung weniger relevant ist. Der verlangsamte Transport könnte außerdem bei Neuronen eine wichtige Rolle spielen, denn in diesen Zellen müssen zum Teil sehr lange Distanzen zurückgelegt werden. Es sei an dieser Stelle daran erinnert, daß die negative Rückkopplung von Cortisol auf die HPA-Funktion v. a. in neuronalen Zellen stattfindet (De Kloet, 2000).

Die Expression von FKBP51 kann in bestimmten Zellen durch Cortisol und Dexamethason induziert werden (Baughman et al., 1991; Baughman et al., 1995). Möglicherweise stellen Veränderungen der Mengen an FKBP51 einen zellulären Mechanismus dar, um die Effektivität und Stärke der Corticosteroid-Antwort zu steuern. Durch solch eine direkte autoregulatorische Schleife könnte die Glucocorticoid-Antwort in bestimmten Geweben besser kontrolliert werden.

Es gibt auch Hinweise darauf, daß durch posttranslationale Veränderungen der Immunophiline ihre Funktionalität verändert werden kann. So kann z.B. FKBP52 durch Caseinkinase II phosphoryliert werden, was zu einem Verlust der Hsp90-Interaktion führt (Miyata et al., 1997). Ob FKBP51 in ähnlicher Weise reguliert werden kann, wurde noch nicht untersucht. Da die Phosphorylierung von FKBP52 durch Caseinkinase II hauptsächlich am Threonin der Position 143 stattfindet (Miyata et al., 1997), kann eine analoge Modifikation für FKBP51 nicht angenommen werden, weil FKBP51 in diesem Bereich kein Threonin besitzt. Bei der Bindung von FKBP51 und FKBP52 an Hsp90 sind zusätzlich zur TPR-Domäne bei beiden Proteinen auch unterschiedliche AS beteiligt (Cheung-Flynn et al., 2003). Es kann deshalb spekuliert werden, daß solche posttranslationalen Veränderungen wahrscheinlich

auch einen unterschiedlichen Einfluss auf ihre Funktionalität ausüben werden. Dadurch kann die Corticoid-Signaltransduktion möglicherweise auch auf dieser Ebene modifiziert werden.

5.2 Spielt FKBP51 bei der Depression eine Rolle?

Die Untersuchungen im Rahmen des M.A.R.S. (Munich-Antidepressant-Response-Signature) Projekts zeigten, daß es eine Assoziation bezüglich des Therapieerfolgs einer Antidepressivabehandlung und SNPs im FKBP51-Gen gibt. Da alle SNPs außerhalb des für FKBP51 kodierenden Bereichs lagen, war es essentiell, eine Korrelation mit dem Expressionsniveau zu prüfen. Da diese Korrelation in der Tat gefunden wurde, ist eine Rolle von FKBP51 in der Depression sehr wahrscheinlich.

Ein im Licht der bisherigen Befunde naheliegender Mechanismus zur Erklärung der FKBP51-Rolle verläuft über die HPA-Achse. Die zentrale Bedeutung der HPA-Aktivität für die Depression wurde vielfach gezeigt (Holsboer, 2000; Plotsky et al., 1998; Steckler et al., 1999). Für die HPA-Aktivität ist wiederum die Funktion der Corticosteroidrezeptoren GR und MR zentral. Die Charakterisierung der Beeinflussung dieser Rezeptoren durch FKBP51 ist ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Wie in Zellkultur gezeigt, beeinflusst FKBP51 nicht nur die Hormonbindung des GRs, sondern verlangsamt auch dessen nukleäre Translokation. Gerade der zweite Effekt kann in depressiven Erkrankungen von Bedeutung sein, weil die Cortisolkonzentration im Blut erhöht ist und unter Sättigungskonzentration der Einfluss auf die Hormonbindung keine Rolle spielt. Die beobachtete erhöhte Menge an FKBP51 bei schnell auf Antidepressiva reagierenden Patienten müsste also zu einer verminderten Aktivität von GR und MR führen. Warum dies zu einem schnelleren Ansprechen auf Antidepressiva führt, ist nicht ohne weiteres zu erklären. Man muß davon ausgehen, daß ein Organismus Adaptationsprozesse aktiviert, wenn er qua seines Genotyps ständig erhöhte Mengen von FKBP51 aufweist. Wie diese Prozesse aussehen, und wie deren Responsivität auf Antidepressiva ist, muß noch erforscht werden.

Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Erklärung des FKBP51-Effekts verläuft über andere Signaltransduktionswege, deren Bedeutung für die Antidepressiva-Wirkung andernorts vorgeschlagen wurden (Li et al., 2002): So wurde für FKBP51 z. B. gezeigt, daß es unabhängig von FK506 und Ca^{2+} mit Calcineurin wechselwirken kann (Li et al., 2002). Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Phosphatase und ist an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse beteiligt, wie z.B. Neurogenese und Ausschüttung von Neurotransmittern. Interessanterweise ist Calcineurin in Zellen des ZNS deutlich höher exprimiert (Klee et al., 1979; Kincaid et al., 1987) v.a. in der CA3 Region des Hippocampus (Morioka et al., 1997). Der Hippocampus ist u.a. für Lernprozesse und Gedächtnisfunktionen wichtig und wird auch durch Corticoide beeinflusst (Jacobson und Sapolsky, 1991).

Da FKBP51 offenbar unabhängig von FK506 mit Calcineurin interagiert (Li et al., 2002), könnten erhöhte Mengen an FKBP51 diesen Signalweg beeinflussen und so vielleicht den Therapieerfolg einer Antidepressivabehandlung verbessern. Es wurde in der Tat gezeigt, daß Überexpression von FKBP51 die Phosphataseaktivität von Calcineurin reduziert (Giraudier et al., 2002). Diese Inhibierung wäre deshalb relevant für die Wirksamkeit von Antidepressiva, weil Kinasen wie die Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII), die der Dephosphorylierung durch Calcineurin entgegenwirken, durch Antidepressiva aktiviert werden (Mori et al., 2001; Consogno et al., 2001). Eine Hemmung von Calcineurin durch FKBP51 hätte also denselben Effekt wie eine Antidepressivabehandlung (Abb. 27) auf den

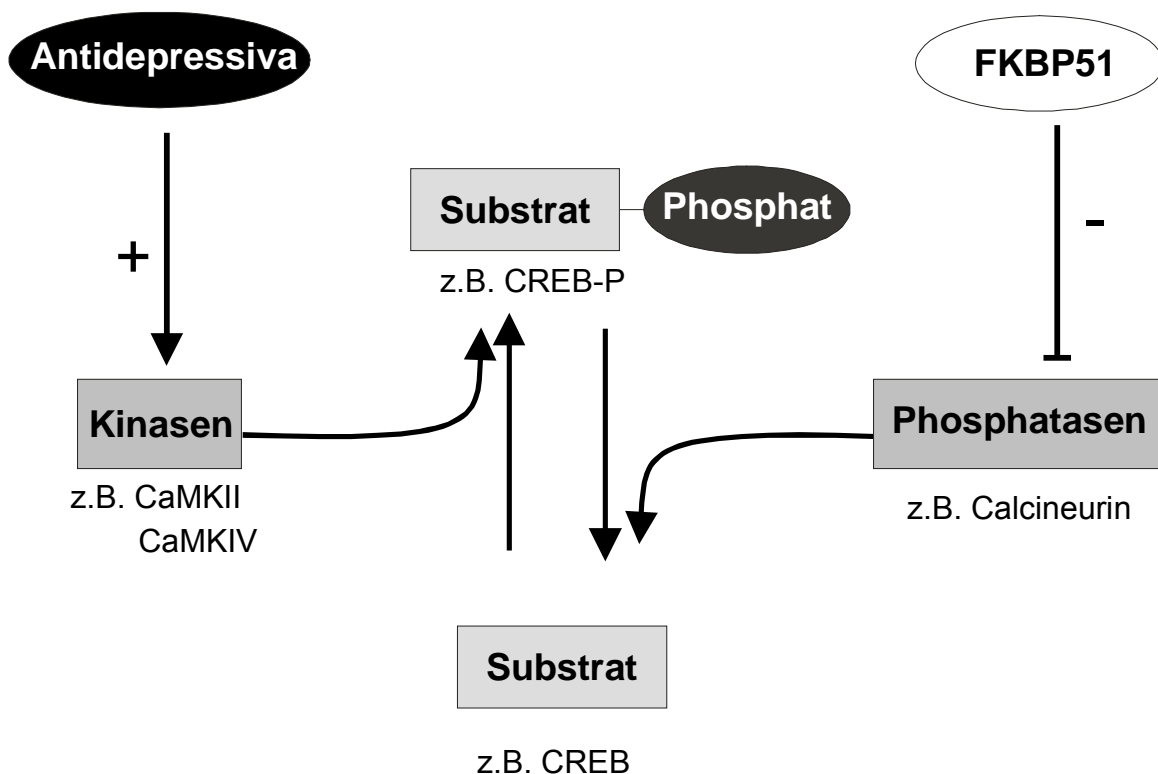


Abb.27: Möglicher Mechanismus von FKBP51 bei Antidepressivabehandlung

Viel zelluläre Prozesse werden durch Phosphorylierung bestimmter Substratproteine reguliert. Dabei führt die Aktivierung von Kinasen zu mehr phosphorylierten Substrat, während die Aktivierung von Phosphatasen dem entgegen wirkt. Hemmt FKBP51 die Aktivität der Phosphatase Calcineurin, dann resultiert dies in mehr phosphorylierten Substraten, ähnlich wie eine Erhöhung der Kinase-Aktivität durch Behandlung mit Antidepressiva. Da Antidepressiva und FKBP51 in die selbe Richtung wirken, wäre dies eine Möglichkeit, warum Patienten mit höheren FKBP51-Mengen schneller auf Antidepressiva ansprechen.

Phosphorylierungsstatus bestimmter Proteine, wie z.B. des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsive element binding protein), der an der Regulierung der Neurotransmitterausschüttung beteiligt ist. Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß die Hemmung von Calcineurin durch FKBP51 in der Literatur nicht unumstritten ist (Li et al., 2002; Giraudier et al., 2002).

Eine indirekte Regulierung von CREB durch FKBP51 wäre deshalb sehr interessant, weil dieser Transkriptionsfaktor sehr wichtig für das neuronale Geschehen ist und seine Aktivität dementsprechend sorgfältig reguliert wird: die Aktivität von CREB ist vom Phosphorylierungsstatus abhängig, der wiederum von der Ca^{2+} Konzentration und von der Dauer eines Stimulus abhängig ist. Calcineurin scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen, weil nach einer kurzen synaptischen Stimulierung phosphoryliertes CREB schnell von Calcineurin dephosphoryliert wird. Erst nach stärkerer Stimulierung kommt es zu einer Hemmung von Calcineurin und damit zur CREB-abhängigen Transkription (Bito et al., 1996). Die Hemmung von Calcineurin erfolgt wahrscheinlich durch Superoxide, die zu einer oxidativen Schädigung des aktiven Zentrums von Calcineurin führen (Wang et al., 1996). Ob das schnellere Ansprechen einer Antidepressivabehandlung wirklich durch eine Beeinflussung von Calcineurin durch FKBP51 zustande kommt, muß noch untersucht werden. Die angestellten Überlegungen reflektieren die mögliche Verknüpfung verschiedener Signalwege durch FKBP51.

5.3 Die Cochaperon-Funktion von p23 in der GR-Transaktivierung

Frühere Untersuchungen von p23 zeigten, daß es auf die einzelnen Steroidrezeptoren unterschiedliche Effekte ausübt (Freeman et al., 2000). Die Aktivität des GR aus Ratten wurde durch Überexpression von p23 erhöht, während der Ratten-MR gehemmt wurde. Der Grund für den Gegensatz zu dieser Arbeit ist nicht bekannt. Es ist allerdings anzumerken, daß unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie etwa die Verwendung von Ratten-GR mit humanem p23 (Freeman et al., 2000) gegenüber humanem GR mit humanem p23 (diese Arbeit) zu den Unterschieden führen könnten. Der hier vorgestellte Befund ist durch verschiedene Kontrollen abgesichert: So wurden z.B. vier verschiedenen Zelllinien verwendet und in allen zeigte sich ein hemmender Effekt von p23 auf den GR. Auch die Mengen von p23 und GR wurden genau analysiert, weil hohe Überexpression eines Faktors zur Reduktion der Rezeptormenge führen könnte (Hofman et al., 2000). Die Menge an GR war unter allen Bedingungen unverändert. Die Verwendung eines induzierbaren Vektors ermöglichte die Feinregulierung der Expression von p23. Selbst bei geringfügig erhöhten p23-Mengen wurde noch eine Hemmung beobachtet. Auch führte die Überexpression von

p23 zu keinem Zerfall von GR-Hsp90 Komplexen. Aus diesen Gründen kann also der hemmende Effekt von p23 auf die GR-vermittelte Transaktivierung als gesichert gelten.

Biochemisch betrachtet kann p23 einerseits durch Bindung von ungefalteten Polypeptiden als eigenständiges Chaperon wirken, andererseits durch seine Interaktion mit Hsp90 auch als Cochaperon agieren. Welche der beiden Funktionen für den Effekt auf den GR verantwortlich ist, war noch nicht untersucht worden. Durch geeignete Mutationen war es möglich, die beiden Aktivitäten getrennt zu analysieren. Es wurde festgestellt, daß die Chaperonaktivität für den hemmenden Einfluss auf den GR keine Bedeutung hat, weil eine C-terminale Deletionsmutante (p23-C35) sich genauso verhielt wie das Wildtyp-p23. In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, daß die Chaperonaktivität von p23 nicht für das ATP-abhängige Ablösen des Substrats von Hsp90 nötig war (Young und Hartl, 2000). Im Gegensatz zur Chaperonaktivität von p23 ist die Hsp90-Interaktion für seine Funktion wichtig, weil die Unterbindung dieser Wechselwirkung zu einem vollständigen Verlust des hemmenden Effekts auf den GR führt. Mutationen von konservierten, hydrophoben AS, die auf einer Seite des Kristalls liegen, sind ausreichend um die Interaktion mit Hsp90 zu unterbinden. Vor kurzem wurden zusätzlich zu den in dieser Arbeit verwendeten auch andere Interaktionsstellen mit Hsp90 identifiziert (Oxelmark et al., 2003). Daraus kann geschlossen werden, daß die konservierte Region von p23, die zwischen AS 86 und 108 liegt, für die Hsp90-Bindung wichtig ist. Eine komplette Deletion dieser Region führt zu einem instabilen Protein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen eine vor kurzem erschienene Publikation, die gezeigt hat, daß p23 zu einem Auseinanderfallen von transkriptionell regulatorischen Komplexen und dadurch auch zu einer Hemmung der GR-Aktivität führt (Freeman und Yamamoto, 2002). Auch Hsp90 zeigte ähnliche Ergebnisse. Durch die Verwendung eines hormonunabhängigen GRs, der keine LBD besitzt und konstitutiv im Kern lokalisiert ist, konnte explizit die nukleäre Wirkung von p23 untersucht werden. Durch Heranziehen der verschiedenen Mutanten konnte gezeigt werden, daß die nukleäre Funktion, wie auch der zytosolische Effekt, die Interaktion von p23 mit Hsp90 benötigen. Hsp90 kann zusammen mit p23 bestimmte Coregulatoren aktivieren oder direkt auf den GR wirken. Für den konstitutiv aktiven GR ist die letztere Erklärung etwas unwahrscheinlicher, weil die Interaktion zwischen GR und Hsp90 durch die C-terminale Ligandenbindungsdomäne bestimmt wird (Dalman et al., 1991), die diesem Rezeptor fehlt. Allerdings kann eine zweite, schwächere Bindungsstelle nicht ausgeschlossen werden. Eine indirekte Beeinflussung des GRs durch Hsp90 über andere Cofaktoren ist ebenfalls möglich, zumal viele Faktoren bekanntermaßen über den N-terminalen Teil des GRs wirken (Wallberg et al., 2000). Welche Transkriptionsfaktoren und Coregulatoren im speziellen verantwortlich sind, muß noch erforscht werden.

5.4 Ausblick

Welche Rolle die einzelnen Chaperone und Cofaktoren, die für die GR Regulierung von Bedeutung sind, auch in der Entstehung von depressiven Erkrankungen spielen, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Effekte auf die Transaktivierung des GRs und MRs analysiert. Bei der Regulation der HPA-Achse spielt aber u.a. die transrepressive Eigenschaft der beiden Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Welche Funktion kann für die Immunophiline bzw. für p23 in Bezug auf die Transrepression angenommen werden?

Transrepression wird entweder durch Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B oder durch Bindung an negativ responsive Elemente ausgelöst, die in bestimmten Promotorregionen zu finden sind. In der Literatur gibt es mittlerweile eine Menge von Hinweisen, daß Chaperone und deren Cofaktoren nicht nur im Zytosol, sondern auch im Kern zu finden sind. Im Hinblick auf die Komplexität von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Protein-DNA-Interaktionen, die in GRE-enthaltenden Promotorregionen vorstatten gehen müssen, kann man sich eine Funktion der Chaperone in diesen Prozessen vorstellen, wie z.B. die Umstrukturierung des Chromatins oder das Ermöglichen einer DNA Bindung. Von Hsp70 wurde berichtet, daß es die ER-Bindung an ERE-haltige Promotoren in vitro erhöht (Landel et al., 1994; Landel et al., 1997). Auch für Hsp90 wurde in vitro ein Einfluss auf die Dissoziation des ERs (Sabbah et al., 1996) und GRs (Kang et al., 1999) von der DNA beschrieben. Auch p23 könnte in solche Prozesse involviert sein, da es als Cochaperon von Hsp90 auch im Kern wirkt. Außerdem wurde gezeigt, daß p23 mit dem aktivierten ER in den Nukleus wandert (Knoblauch und Garabedian, 1999) und die transkriptionelle Aktivität von AP-1 und NF- κ B reduziert (Freeman und Yamamoto, 2002). Aus diesem Grund kann ein Einfluss von p23 auch auf die transrepressive Eigenschaft des GRs nicht ausgeschlossen werden. p23 könnte in seiner Rolle als Cochaperon z.B. Interaktionen des GRs mit anderen Transkriptionsfaktoren fördern oder unterbinden, oder auch den GR daran hindern an nGREs zu binden bzw. für die Dissoziation dieser Komplexe sorgen. Somit kann spekuliert werden, daß p23 neben seiner hemmenden Funktion auf die Transaktivierung auch eine Funktion auf die Transrepressionsaktivität des GRs besitzt.

Auch für die Immunophiline ist eine Beeinflussung der Transrepression vorstellbar. Da der konstitutiv aktive GR durch Überexpression der Immunophiline nicht gehemmt wurde, kann man nicht direkt auf eine nukleäre Funktion der beiden Proteine schließen. Allerdings läßt das Auftreten von FKBP52 im Kern eine nukleäre Funktion für dieses Protein vermuten (Czar et al., 1995). Eine Hemmung der Transrepression des GRs kann prinzipiell durch eine verminderte Hormonbindung oder über eine verlangsamte nukleäre Translokation erfolgen.

Die Transrepression von NF- κ B erfordert die Hormonbindung des GRs (Hofmann et al., 1998; Scheinman et al., 1995).

Der Einfluss der hier bearbeiteten Cochaperone auf die transrepressiven Eigenschaften der Corticoidrezeptoren muß noch untersucht werden. Außerdem ist über die transkriptionelle Regulierung der Immunophiline und p23 noch wenig bekannt. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die erhöhte Expression von FKBP51 in schnell respondierenden Patienten von Bedeutung. Schließlich könnte die Funktionalität dieser Proteine durch posttranslationale Modifikationen deutlich verändert werden. Durch transgene Mäuse, die einen der Faktoren gezielt überexprimieren, könnte ein möglicher Einfluss auf das Verhalten, die HPA-Achse oder Lernprozesse in einem physiologischeren System untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Um die Therapiemöglichkeiten bei depressiven Störungen zu verbessern, ist die Kenntnis der molekularen Grundlagen dieser Erkrankungen notwendig. Die erhöhten basalen Cortisolwerte im Serum von depressiven Patienten und die gestörte negative Rückkopplung der HPA-Achse sind Hinweise darauf, daß die Funktionsweise der Rezeptoren für Corticoide wie Cortisol eingeschränkt ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Cochaperonen für die Corticoid-Signaltransduktion, insbesondere den Immunophilinen FKBP51 und FKBP52, sowie p23. Für die Immunophilinen wurde entdeckt, daß für ihren Beitrag zu einer effizienten Aktivierung Corticoid-abhängiger Promotoren drei Eigenschaften von Bedeutung sind: 1. Interaktion mit Hsp90, um überhaupt den Zugang zum Heterokomplex zu erhalten, 2. Wechselwirkung mit Dynein, um den nukleären Transport der Rezeptoren zu begünstigen und 3. die Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität. Diese Postulate gründen sich auf die folgenden experimentellen Befunde: Das Immunophilin FKBP51 reduziert als Bestandteil des Heterokomplexes mit Hsp90 und den Corticoidrezeptoren sowohl die Bindungsaffinität (Denny et al., 2000) als auch die nukleäre Translokation des Glucocorticoidrezeptors (GRs) und des Mineralocorticoidrezeptors (MRs). Im Gegensatz zu seinem Homologen FKBP52 zeigt FKBP51 nur eine geringe Interaktion mit dem Motorprotein Dynein, welches für den retrograden Transport verantwortlich ist. Durch Einführung einer Punktmutation, die die Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität inaktiviert, konnte gezeigt werden, daß FKBP51 diese Aktivität nicht für seine inhibierende Wirkung benötigt. Im Gegensatz dazu liefert die PPIase-Aktivität von FKBP52 einen aktiven Beitrag für die Funktionalität der Corticoidrezeptoren, weil die analoge Mutation in FKBP52 zur einer Hemmung der Transaktivierung und nukleären Translokation des GRs und des MRs führt. Da diese Mutante immer noch mit Dynein interagiert, ist allein die Wechselwirkung mit diesem Motorprotein offensichtlich nicht ausreichend für die volle GR-Aktivität.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß Polymorphismen im FKBP51-Gen nicht nur mit dem Erfolg einer Antidepressivabehandlung korrelieren, sondern auch mit den Proteinmengen von FKBP51 in Lymphozyten.

Schließlich wurde die Bedeutung von p23 analysiert, einem kleinen Cochaperon von Hsp90, dem aber auch eigene Chaperonaktivität zugeschrieben wurde. Durch gezielte Mutationen im p23-Protein war es möglich, seine Chaperonaktivität getrennt von seiner Cochaperon-Funktion zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß p23 für die Hemmung der GR-abhängigen Transkription nur als Hsp90-Cochaperon fungiert, weil zwar seine Interaktion mit Hsp90 für diesen Effekt notwendig war, nicht aber seine Chaperonaktivität. Um die beschriebene nukleäre Rolle von p23, die zum Zerfall von GR-Transkriptionskomplexen

führt, zu untersuchen, wurde ein konstitutiv nukleärer GR verwendet. Auch hier benötigt p23 für die Hemmung des Rezeptors seine Hsp90-Interaktion, nicht aber seine Chaperonaktivität. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Chaperonen in der Steroid-Signaltransduktion. Darüber hinaus wurden starke Hinweise für eine mögliche Rolle von FKBP51 bei der Depression entdeckt.

7. Literaturverzeichnis

- Agarwal, M.K., Coupry, F., und Philippe, M.** (1977). Physiological activity and receptor binding of 9 alpha fluorohydrocortisone. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 747-753.
- Agashe, V.R. und Hartl, F.U.** (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin.Cell Dev.Biol.* **11**, 15-25.
- Almlöf, T., Wallberg, A.E., Gustafsson, J.A., und Wright, A.P.** (1998). Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry* **37**, 9586-9594.
- Anfinsen, C.B.** (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Barent, R.L., Nair, S.C., Carr, D.C., Ruan, Y., Rimerman, R.A., Fulton, J., Zhang, Y., und Smith, D.F.** (1998). Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol.Endocrinol.* **12**, 342-354.
- Barnes, P.J.** (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin.Sci.(Colch.)* **94**, 557-572.
- Baughman, G., Harrigan, M.T., Campbell, N.F., Nurrish, S.J., und Bourgeois, S.** (1991). Genes newly identified as regulated by glucocorticoids in murine thymocytes. *Mol.Endocrinol.* **5**, 637-644.
- Baughman, G., Wiederrecht, G.J., Campbell, N.F., Martin, M.M., und Bourgeois, S.** (1995). FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Mol.Cell Biol.* **15**, 4395-4402.
- Baughman, G., Wiederrecht, G.J., Chang, F., Martin, M.M., und Bourgeois, S.** (1997). Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 437-443.
- Beato, M., Herrlich, P., und Schütz, G.** (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.

-
- Bell, D.R. und Poland, A.** (2000). Binding of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein (AIP); the role of hsp90. *J.Biol.Chem.* **275**, 36407-36414.
- Bharadwaj, S., Ali, A., und Ovsenek, N.** (1999). Multiple Components of the HSP90 Chaperone Complex Function in Regulation of Heat Shock Factor 1 In Vivo. *Mol Cell Biol* **19**, 8033-8041.
- Bito, H., Deisseroth, K., und Tsien, R.W.** (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**, 1203-1214.
- Bohen, S.P.** (1998). Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamycin antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins. *Mol.Cell Biol.* **18**, 3330-3339.
- Bose, S., Weikl, T., Bugl, H., und Buchner, J.** (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* **274**, 1715-1717.
- Boumpas, D.T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Cupps, T.R., und Balow, J.E.** (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* **119**, 1198-1208.
- Brinkmann, A.O.** (1994). Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. *J.Pediatr.Endocrinol* **7**, 275-282.
- Brönnegård, Stierna, P., und Marcus, C.** (1996). Glucocorticoid resistant syndromes--molecular basis and clinical presentations. *J.Neuroendocrinol.* **8**, 405-415.
- Buchner, J.** (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* **10**, 10-19.
- Buchner, J.** (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**, 136-141.
- Butler, P.W. und Besser, G.M.** (1968). Pituitary-adrenal function in severe depressive illness. *Lancet* **1**, 1234-1236.
- Cadepond, F., Gasc, J.M., Delahaye, F., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Evans, R., und Baulieu, E.E.** (1992). Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp.Cell Res.* **201**, 99-108.

-
- Callebaut, I., Renoir, J.M., Lebeau, M.C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.E., und Mornon, J.P.** (1992). An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 6270-6274.
- Chambrud, B., Rouviere-Fourmy, N., Radanyi, C., Hsiao, K., Peattie, D.A., Livingston, D.J., und Baulieu, E.E.** (1993). Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPlase activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **196**, 160-166.
- Chen, M.S., Silverstein, A.M., Pratt, W.B., und Chinkers, M.** (1996). The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J.Biol.Chem.* **271**, 32315-32320.
- Chen, S., Sullivan, W.P., Toft, D.O., und Smith, D.F.** (1998). Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress.Chaperones.* **3**, 118-129.
- Cheung-Flynn, J., Roberts, P.J., Riggs, D.L., und Smith, D.F.** (2003). C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *J Biol Chem* **278**, 17388-17394.
- Chrousos, G.P., Loriaux, D.L., Tomita, M., Brandon, D.D., Renquist, D., Albertson, B., und Lipsett, M.B.** (1986). The new world primates as animal models of glucocorticoid resistance. *Adv.Exp.Med.Biol* **196**, 129-144.
- Clipstone, N.A. und Crabtree, G.R.** (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-697.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höhfeld, J., und Patterson, C.** (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat.Cell Biol.* **3**, 93-96.
- Consogno, E., Racagni, G., und Popoli, M.** (2001). Modifications in brain CaM kinase II after long-term treatment with desmethylimipramine. *Neuropsychopharmacology* **24**, 21-30.
- Creighton, T.E.** (1984). Pathways and mechanisms of protein folding. *Adv.Biophys.* **18** , 1-20.

-
- Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M., und Pratt, W.B.** (1995). Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol Endocrinol* **9**, 1549-1560.
- Dalman, F.C., Scherrer, L.C., Taylor, L.P., Akil, H., und Pratt, W.B.** (1991). Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J.Biol.Chem.* **266**, 3482-3490.
- Das, A.K., Cohen, P.W., und Barford, D.** (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**, 1192-1199.
- Davies, T.H., Ning, Y.M., und Sanchez, E.R.** (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J.Biol.Chem.* **277**, 4597-4600.
- De Kloet, E.R.** (2000). Stress in the brain. *Eur.J.Pharmacol.* **405**, 187-198.
- De Kloet, E.R., Oitzl, M.S., und Joels, M.** (1993). Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol.Neurobiol.* **13**, 433-455.
- De Kloet, E.R., Reul, J.M., de Ronde, F.S., Bloemers, M., und Ratka, A.** (1986). Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J Steroid Biochem* **25**, 723-731.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., und Joels, M.** (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr.Rev.* **19**, 269-301.
- Denny, W.B., Valentine, D.L., Reynolds, P.D., Smith, D.F., und Scammell, J.G.** (2000). Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* **141**, 4107-4113.
- Deuschle, M., Weber, B., Colla, M., Muller, M., Kniest, A., und Heuser, I.** (1998). Mineralocorticoid receptor also modulates basal activity of hypothalamus-pituitary-adrenocortical system in humans. *Neuroendocrinology.* **68**, 355-360.
- Dittmar, K.D. und Pratt, W.B.** (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J.Biol.Chem.* **272**, 13047-13054.

-
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., und Heitman, J.** (1997). All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13093-13098.
- Ellis, R.J.** (1990). The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol* **1**, 1-9.
- Evans-Storms, R.B. und Cidlowski, J.A.** (1995). Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 1-8.
- Evans, R.M.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J., und Caplan, A.J.** (1998). SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3727-3734.
- Fink, A.L.** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* **79**, 425-449.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., und Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Freeman, B.C., Felts, S.J., Toft, D.O., und Yamamoto, K.R.** (2000). The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev* **14**, 422-434.
- Freeman, B.C., Toft, D.O., und Morimoto, R.I.** (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* **274**, 1718-1720.
- Freeman, B.C. und Yamamoto, K.R.** (2002). Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* **296**, 2232-2235.
- Gaillard, C. und Strauss, F.** (1990). Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* **18**, 378
- Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Murphy, P.J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J.M., Zhang, M., und Pratt, W.B.** (2002). Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* **41**, 13602-13610.

-
- Galigniana, M.D., Radanyi, C., Renoir, J.M., Housley, P.R., und Pratt, W.B.** (2001). Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J.Biol.Chem.* **276**, 14884-14889.
- Galigniana, M.D., Scruggs, J.L., Herrington, J., Welsh, M.J., Carter-Su, C., Housley, P.R., und Pratt, W.B.** (1998). Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol.Endocrinol.* **12**, 1903-1913.
- Gasc, J.M., Renoir, J.M., Faber, L.E., Delahaye, F., und Baulieu, E.E.** (1990). Nuclear localization of two steroid receptor-associated proteins, hsp90 and p59. *Exp Cell Res* **186**, 362-367.
- Georgopoulos, C. und Welch, W.J.** (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu.Rev.Cell Biol.* **9**, 601-634.
- Gething, M.J. und Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., und Evans, R.M.** (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652.
- Giraudier, S., Chagraoui, H., Komura, E., Barnache, S., Blanchet, B., LeCouedic, J.P., Smith, D.F., Larbret, F., Taksin, A.L., Moreau-Gachelin, F., Casadevall, N., Tulliez, M., Hulin, A., Debili, N., und Vainchenker, W.** (2002). Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood* **100**, 2932-2940.
- Grammatikakis, N., Lin, J.H., Grammatikakis, A., Tsihchlis, P.N., und Cochran, B.H.** (1999). p50(cdc37) Acting in Concert with Hsp90 Is Required for Raf-1 Function. *Mol.Cell Biol.* **19**, 1661-1672.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D., und Toft, D.O.** (1999). The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J Biol Chem* **274**, 17525-17533.
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., und Voellmy, R.** (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J.Biol.Chem.* **276**, 45791-45799.

-
- Hamilton, G.S. und Steiner, J.P.** (1998). Immunophilins: beyond immunosuppression. *J.Med.Chem.* **41**, 5119-5143.
- Hartl, F.U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579.
- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.
- Hartl, U.** (1998). Highlight: protein folding in vivo. *Biol.Chem.* **379**, 235
- Heid, S.E., Pollenz, R.S., und Swanson, H.I.** (2000). Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **57**, 82-92.
- Heuser, I. und Lammers, C.H.** (2003). Stress and the brain. *Neurobiol Aging* **24 Suppl 1**, 69-76.
- Heuser, I., Yassouridis, A., und Holsboer, F.** (1994). The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* **28**, 341-356.
- Hofman, K., Swinnen, J.V., Claessens, F., Verhoeven, G., und Heyns, W.** (2000). Apparent coactivation due to interference of expression constructs with nuclear receptor expression. *Mol.Cell Endocrinol.* **168**, 21-29.
- Hofmann, T.G., Hehner, S.P., Bacher, S., Droge, W., und Schmitz, M.L.** (1998). Various glucocorticoids differ in their ability to induce gene expression, apoptosis and to repress NF-kappaB-dependent transcription. *FEBS Lett* **441**, 441-446.
- Hollenberg, S.M. und Evans, R.M.** (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **55**, 899-906.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., und Evans, R.M.** (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* **49**, 39-46.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., und Evans, R.M.** (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635-641.
- Holsboer, F.** (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**, 477-501.

-
- Holsboer, F. und Barden, N.** (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr.Rev.* **17**, 187-205.
- Holsboer, F., Liebl, R., und Hofschuster, E.** (1982). Repeated dexamethasone suppression test during depressive illness. Normalisation of test result compared with clinical improvement. *J Affect Disord* **4**, 93-101.
- Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., Wright, W.E., und White, M.A.** (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* **13**, 817-826.
- Hubler, T.R., Denny, W.B., Valentine, D.L., Cheung-Flynn, J., Smith, D.F., und Scammell, J.G.** (2003). The FK506-Binding Immunophilin FKBP51 Is Transcriptionally Regulated by Progesterin and Attenuates Progesterin Responsiveness. *Endocrinology* **144**, 2380-2387.
- Huizenga, N.A., de Lange, P., Koper, J.W., de Herder, W.W., Abs, R., Kasteren, J.H., de Jong, F.H., und Lamberts, S.W.** (2000). Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene [In Process Citation]. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **85**, 2076-2081.
- Hutchison, K.A., Scherrer, L.C., Czar, M.J., Ning, Y., Sanchez, E.R., Leach, K.L., Deibel, M.R.J., und Pratt, W.B.** (1993). FK506 binding to the 56-kilodalton immunophilin (Hsp56) in the glucocorticoid receptor heterocomplex has no effect on receptor folding or function. *Biochemistry* **32**, 3953-3957.
- Hutchison, K.A., Stancato, L.F., Owens-Grillo, J.K., Johnson, J.L., Krishna, P., Toft, D.O., und Pratt, W.B.** (1995). The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J.Biol.Chem.* **270**, 18841-18847.
- Jacobson, L. und Sapolsky, R.** (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic- pituitary-adrenocortical axis. *Endocr.Rev.* **12**, 118-134.
- Jaenicke, R.** (1993). What does protein refolding in vitro tell us about protein folding in the cell? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **339**, 287-294.

-
- Joels, M. und De Kloet, E.R.** (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog.Neurobiol.* **43**, 1-36.
- Johnson, J.L., Beito, T.G., Krco, C.J., und Toft, D.O.** (1994). Characterization of a novel 23-kilodalton protein of unactive progesterone receptor complexes. *Mol.Cell Biol.* **14**, 1956-1963.
- Kang, K.I., Meng, X., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., Chadli, A., Cadepond, F., Baulieu, E.E., und Catelli, M.G.** (1999). The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 1439-1444.
- Kim, P.S. und Baldwin, R.L.** (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu.Rev.Biochem.* **51**, 459-489.
- Kincaid, R.L., Balaban, C.D., und Billingsley, M.L.** (1987). Differential localization of calmodulin-dependent enzymes in rat brain: evidence for selective expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase in specific neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1118-1122.
- Kino, T. und Chrousos, G.P.** (2001). EUROSTERONE MEETING Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J.Endocrinol.* **169**, 437-445.
- Kino, T. und Chrousos, G.P.** (2002). Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 609-613.
- Klee, C.B., Crouch, T.H., und Krinks, M.H.** (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6270-6273.
- Knoblauch, R. und Garabedian, M.J.** (1999). Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol.Cell Biol.* **19**, 3748-3759.
- Koper, J.W., Stolk, R.P., de Lange, P., Huizenga, N.A., Molijn, G.J., Pols, H.A., Grobbee, D.E., Karl, M., de Jong, F.H., Brinkmann, A.O., und Lamberts, S.W.** (1997). Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum.Genet.* **99**, 663-668.
- Kovacs, K.J. und Sawchenko, P.E.** (1996). Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci* **7**, 125-133.

-
- Kralli, A. und Yamamoto, K.R.** (1996). An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones. *J.Biol.Chem.* **271**, 17152-17156.
- Kucera, T., Waltner-Law, M., Scott, D.K., Prasad, R., und Granner, D.K.** (2002). A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol Chem* **277**, 26098-26102.
- Kurek, I., Stoger, E., Dulberger, R., Christou, P., und Breiman, A.** (2002). Overexpression of the wheat FK506-binding protein 73 (FKBP73) and the heat-induced wheat FKBP77 in transgenic wheat reveals different functions of the two isoforms. *Transgenic Res* **11**, 373-379.
- Landel, C.C., Kushner, P.J., und Greene, G.L.** (1994). The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol.Endocrinol.* **8**, 1407-1419.
- Landel, C.C., Potthoff, S.J., Nardulli, A.M., Kushner, P.J., und Greene, G.L.** (1997). Estrogen receptor accessory proteins augment receptor-DNA interaction and DNA bending. *J Steroid Biochem.Mol.Biol* **63**, 59-73.
- Le Bihan, S., Marsaud, V., Mercier-Bodard, C., Baulieu, E.E., Mader, S., White, J.H., und Renoir, J.M.** (1998). Calcium/calmodulin kinase inhibitors and immunosuppressant macrolides rapamycin and FK506 inhibit progesterin- and glucocorticosteroid receptor-mediated transcription in human breast cancer T47D cells. *Mol.Endocrinol.* **12**, 986-1001.
- Lebeau, M.C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L.E., Renoir, J.M., Radanyi, C., und Baulieu, E.E.** (1992). P59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J Biol Chem* **267**, 4281-4284.
- Leo, C. und Chen, J.D.** (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**, 1-11.
- Levine, S.** (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* **405**, 149-160.

-
- Li, T.K., Baksh, S., Cristillo, A.D., und Bierer, B.E.** (2002). Calcium- and FK506-independent interaction between the immunophilin FKBP51 and calcineurin. *J.Cell Biochem.* **84**, 460-471.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R., und Buchner, J.** (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci* **2**, 1490-1496.
- Lim, V.I. und Spirin, A.S.** (1986). Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation. Conformation of nascent peptide. *J Mol Biol* **188**, 565-574.
- Liu, J., Albers, M.W., Wandless, T.J., Luan, S., Alberg, D.G., Belshaw, P.J., Cohen, P., MacKintosh, C., Klee, C.B., und Schreiber, S.L.** (1992). Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896-3901.
- Ma, H., Hong, H., Huang, S.M., Irvine, R.A., Webb, P., Kushner, P.J., Coetzee, G.A., und Stallcup, M.R.** (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 6164-6173.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., und Chambon, P.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Massol, N., Lebeau, M.C., Renoir, J.M., Faber, L.E., und Baulieu, E.E.** (1992). Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **187**, 1330-1335.
- McLaughlin, S.H., Smith, H.W., und Jackson, S.E.** (2002). Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J.Mol.Biol.* **315**, 787-798.
- Milhon, J., Lee, S., Kohli, K., Chen, D., Hong, H., und Stallcup, M.R.** (1997). Identification of amino acids in the tau 2-region of the mouse glucocorticoid receptor that contribute to hormone binding and transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **11**, 1795-1805.
- Miyata, Y., Chambraud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M.C., Renoir, J.M., Shirai, R., Catelli, M.G., Yahara, I., und Baulieu, E.E.** (1997). Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14500-14505.

-
- Mori, S., Popoli, M., Brunello, N., Racagni, G., und Perez, J.** (2001). Effect of reboxetine treatment on brain cAMP- and calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Neuropharmacology* **40**, 448-456.
- Morioka, M., Nagahiro, S., Fukunaga, K., Miyamoto, E., und Ushio, Y.** (1997). Calcineurin in the adult rat hippocampus: different distribution in CA1 and CA3 subfields. *Neuroscience* **78**, 673-684.
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Silverstein, A.M., Dittmar, K.D., Estrada, L., und Pratt, W.B.** (2000). The Hsp Organizer Protein Hop Enhances the Rate of but Is Not Essential for Glucocorticoid Receptor Folding by the Multiprotein Hsp90-based Chaperone System. *J Biol Chem* **275**, 6894-6900.
- Moutsatsou, P., Tsolakidou, A., Trikkas, G., Troungos, C., und Sekeris, C.E.** (2000). Glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms are not mutated in bipolar affective disorder. *Mol.Psychiatry* **5**, 196-202.
- Murray, C.J. und Lopez, A.D.** (1996). Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **274**, 740-743.
- Nagata, Y., Anan, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Taya, Y., Fujiwara, T., Kato, H., Saya, H., und Nakao, M.** (1999). The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. *Oncogene* **18**, 6037-6049.
- Nair, S.C., Rimerman, R.A., Toran, E.J., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R.N., und Smith, D.F.** (1997). Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol.Cell Biol.* **17**, 594-603.
- Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H., und Takagi, T.** (1997). Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). Probing with a library of anti-HSP90 monoclonal antibodies and limited proteolysis. *J.Biol.Chem.* **272**, 26179-26187.
- Ning, Y.M. und Sanchez, E.R.** (1993). Potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by the immunophilin ligands FK506 and rapamycin. *J.Biol.Chem.* **268**, 6073-6076.

-
- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., und Hartl, F.U.** (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* **143**, 901-910.
- Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H., und Pratt, W.B.** (1996). A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J Biol Chem* **271**, 13468-13475.
- Owens, M.J. und Nemeroff, C.B.** (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp* **172**, 296-308.
- Oxelmark, E., Knoblauch, R., Arnal, S., Su, L.F., Schapira, M., und Garabedian, M.J.** (2003). Genetic dissection of p23, an Hsp90 cochaperone, reveals a distinct surface involved in estrogen receptor signaling. *J.Biol.Chem.* **278**, 36547-36555.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H.** (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* **17**, 4829-4836.
- Paskitti, M.E., McCreary, B.J., und Herman, J.P.** (2000). Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis [In Process Citation]. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **80**, 142-152.
- Pirkl, F. und Buchner, J.** (2001a). Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J.Mol.Biol.* **308**, 795-806.
- Pirkl, F., Fischer, E., Modrow, S., und Buchner, J.** (2001b). Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J.Biol.Chem.* **276**, 37034-37041.
- Plotsky, P.M., Owens, M.J., und Nemeroff, C.B.** (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr.Clin.North Am.* **21**, 293-307.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O.** (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**, 306-360.

-
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H.** (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**, 65-75.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H.** (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)- domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**, 754-762.
- Radanyi, C., Chambrud, B., und Baulieu, E.E.** (1994). The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 11197-11201.
- Rajapandi, T., Greene, L.E., und Eisenberg, E.** (2000). The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **275**, 22597-22604.
- Ramsey, A.J., Russell, L.C., Whitt, S.R., und Chinkers, M.** (2000). Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J.Biol.Chem.* **275**, 17857-17862.
- Reynolds, P.D., Ruan, Y., Smith, D.F., und Scammell, J.G.** (1999). Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *J.Clin.Endocrinol Metab.* **84**, 663-669.
- Riad, M., Mogos, M., Thangathurai, D., und Lumb, P.D.** (2002). Steroids. *Curr Opin Crit Care* **8**, 281-284.
- Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., und Smith, D.F.** (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J.* **22**, 1158-1167.
- Roe, S.M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H.** (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J.Med.Chem.* **42**, 260-266.
- Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., und Chinkers, M.** (1999). Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J Biol Chem* **274**, 20060-20063.

-
- Rutherford, S.L. und Lindquist, S.** (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**, 336-342.
- Sabbah, M., Radanyi, C., Redeuilh, G., und Baulieu, E.E.** (1996). The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem.J* **314**, 205-213.
- Sanchez, E.R.** (1990). Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J.Biol.Chem.* **265**, 22067-22070.
- Sapolsky, R.M. und McEwen, B.S.** (1985). Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain Res* **339**, 161-165.
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., und Smith, D.F.** (2001). Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen.Comp.Endocrinol.* **124**, 152-165.
- Scheibel, T., Weikl, T., und Buchner, J.** (1998). Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 1495-1499.
- Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., und Baldwin, A.S.J.** (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 943-953.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., und Moarefi, I.** (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schmid, W., Cole, T.J., Blendy, J.A., und Schütz, G.** (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **53**, 33-35.
- Schulte, T.W., Blagosklonny, M.V., Ingui, C., und Neckers, L.** (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J.Biol.Chem.* **270**, 24585-24588.
- Sepehrnia, B., Paz, I.B., Dasgupta, G., und Momand, J.** (1996). Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell. *J.Biol.Chem.* **271**, 15084-15090.

-
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., und Matzuk, M.M.** (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* **391**, 489-492.
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Kanelakis, K.C., Radanyi, C., Renoir, J.M., und Pratt, W.B.** (1999). Different Regions of the Immunophilin FKBP52 Determine Its Association with the Glucocorticoid Receptor, hsp90, and Cytoplasmic Dynein. *J Biol Chem* **274**, 36980-36986.
- Smith, D.F.** (1998). Sequence motifs shared between chaperone components participating in the assembly of progesterone receptor complexes. *Biol.Chem.* **379**, 283-288.
- Smith, D.F., Albers, M.W., Schreiber, S.L., Leach, K.L., und Deibel, M.R.J.** (1993). FKBP54, a novel FK506-binding protein in avian progesterone receptor complexes and HeLa extracts. *J.Biol.Chem.* **268**, 24270-24273.
- Smith, D.F., Faber, L.E., und Toft, D.O.** (1990). Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem* **265**, 3996-4003.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., und Journot, L.** (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**, 170-175.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., und Pavletich, N.P.** (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239-250.
- Steckler, T., Holsboer, F., und Reul, J.M.** (1999). Glucocorticoids and depression. *Baillieres.Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* **13**, 597-614.
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E.S., Litwack, G., und Toft, D.** (1997). Nucleotides and two functional states of hsp90. *J.Biol.Chem.* **272**, 8007-8012.
- Tai, P.K., Albers, M.W., Chang, H., Faber, L.E., und Schreiber, S.L.** (1992). Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* **256**, 1315-1318.
- Vermeer, H., Hendriks-Stegeman, B.I., van der Burg, B., Van Buul-Offers, S.C., und Jansen, M.** (2003). Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51

- messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 277-284.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J.D., Caboche, M., und Bellini, C.** (1998). Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol Cell Biol* **18**, 3034-3043.
- Voellmy, R., Ahmed, A., Schiller, P., Bromley, P., und Rungger, D.** (1985). Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82**, 4949-4953.
- Wallberg, A.E., Flinn, E.M., Gustafsson, J.A., und Wright, A.P.** (2000). Recruitment of chromatin remodelling factors during gene activation via the glucocorticoid receptor N-terminal domain. *Biochem.Soc.Trans.* **28**, 410-414.
- Wang, X., Culotta, V.C., und Klee, C.B.** (1996). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* **383**, 434-437.
- Weaver, A.J., Sullivan, W.P., Felts, S.J., Owen, B.A., und Toft, D.O.** (2000). Crystal structure and activity of Human p23, an hsp90 Co-chaperone. *J.Biol.Chem.* **275**, 23045-23052.
- Webster, M.J., Knable, M.B., O'Grady, J., Orthmann, J., und Weickert, C.S.** (2002). Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol.Psychiatry* **7**, 985-94, 924.
- Weikl, T., Abelmann, K., und Buchner, J.** (1999). An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. *J Mol Biol* **293**, 685-691.
- Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J., und Buchner, J.** (2000). C-terminal Regions of Hsp90 are Important for Trapping the Nucleotide during the ATPase Cycle. *J.Mol.Biol.* **303**, 583-592.
- Welch, W.J. und Feramisco, J.R.** (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem* **257**, 14949-14959.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E., und Neckers, L.M.** (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 8324-8328.

-
- Winklhofer, K.F., Reintjes, A., Hoener, M.C., Voellmy, R., und Tatzelt, J.** (2001). Geldanamycin restores a defective heat shock response in vivo. *J.Biol.Chem.* **276**, 45160-45167.
- Xu, Y., Singer, M.A., und Lindquist, S.** (1999). Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 109-114.
- Young, J.C. und Hartl, F.U.** (2000). Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J* **19**, 5930-5940.
- Young, J.C., Schneider, C., und Hartl, F.U.** (1997). In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.* **418**, 139-143.
- Zennaro, M.C.** (1998). Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. *Eur.J.Endocrinol.* **139**, 127-138.
- Zobel, A.W., Yassouridis, A., Frieboes, R.M., und Holsboer, F.** (1999). Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am.J.Psychiatry* **156**, 949-951.
- Zuo, J., Rungger, D., und Voellmy, R.** (1995). Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol.Cell Biol.* **15**, 4319-4330.

8. Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotropines Hormon
AF1	Aktivierungsfunktion 1
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
CR	Corticoidrezeptor
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Cyp	Cyclophilin
Dex	Dexamethason
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E.coli	Escherichia coli
ER	Östrogenrezeptor engl.: Estrogenrezeptor
FKBP	FK506 Binding Protein
GR	Glucocorticoid Rezeptor
GRE	Glucocorticoid responsives Element
HA-Tag	Hemagglutinin-Tag
HIS	Histidin-Tag
Hsp	Hsp-organisierendes-Protein
HPA-Achse	engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HSF-1	Hitze Schock Transkriptionsfaktor 1
Hsp	Hitzeschockprotein
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MCS	Multiple cloning site
min	Minute
MMTV	mouse mammary tumor virus
MR	Mineralocorticoid Rezeptor
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NF-kB	nuclear factor-kappaB
OD	optische Dichte
PP5	Proteinphosphatase5
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PR	Progesteronrezeptor
PVN	Nucleus paraventricularis

sek	Sekunde
β-Gal	β-Galaktosidase
Std	Stunde
TPR	T etratrico p eptid r epeat
WT	Wildtyp
ZNS	Z entrales N ervensystem

Lebenslauf

Name: Gabriela Monika Wochnik
Geburtsdatum: 27.09.1973
Geburtsort: Beuthen (Oberschlesien)
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09.1980 – 07.1982	Karl-Lederer-Volksschule Geretsried
09.1982 – 07.1984	Volksschule Kaufering (Grundschule)
09.1984 – 07.1985	Volksschule Kaufering (Hauptschule)
09.1985 – 07.1994	Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg a. Lech

Studium:

11.1994 – 12.1998	Ludwig-Maximilians-Universität München Studiengang: Lebensmittelchemie Abschluß: Staatsexamen 1.Staatsexamen: 07.1998 – 12.1998
seit 01.1999	Dissertation am Max-Planck-Institut für Psychiatrie München unter der Betreuung von Prof. F. Holsboer

Thema: Die Funktion der Cochaperone FKBP51, FKBP52 und p23 bei der Signaltransduktion der Corticoidrezeptoren