

**Untersuchung der Interaktion zwischen
NCoA-Koaktivator-Proteinen in der
Transkriptionsregulation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften (15)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Marco Lodrini
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2007

D30

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. R. Wittig
Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz
PD Dr. E. Pfitzner

Datum der Disputation:

Eidesstattliche Erklärung

Die selbstständige Anfertigung dieser Arbeit erkläre ich an Eides statt.

Frankfurt am Main, den 3. Juli 2007.

(Marco Lodrini)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Regulation der Genexpression	1
1.1.1 Die basale Transkriptionsaktivierung durch die generelle Transkriptionsmaschinerie.....	1
1.1.2 Transkriptionsfaktoren	2
1.1.2.1 STAT-Proteine.....	2
1.1.2.2 Nukleäre Hormonrezeptoren	4
1.2 Koaktivatoren	6
1.2.1 Rolle von Koaktivatoren bei der Genexpression.....	6
1.2.2 Familie der NCoA/SRC-Koaktivatoren	8
1.2.3 NCoA-1 (SRC-1)	11
1.2.4 NCoA-2 (SRC-2, GRIP1 oder TIF2).....	12
1.2.5 NCoA-3 (p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1 oder TRAM-1)	14
1.2.6 Rolle von NCoA-Proteinen bei pathologischen Abweichungen	15
1.2.7 Rekrutierung von Koaktivatoren.....	18
1.3 LXXLL-Motive	20
1.4 PAS-Domänen	22
1.5 Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Verbrauchsmaterial	25
2.1.2 Chemikalien.....	25
2.1.3 Lösungen und Puffer	27
2.1.4 Kits und Größenstandard-Marker.....	27
2.1.5 Enzyme	28
2.1.6 Antikörper	28
2.1.7 Oligonukleotide.....	29
2.1.8 Peptide	31
2.1.9 Vektoren	32
2.1.10 Bakterien und Bakterienmedien	36
2.1.11 Zellkulturlösungen	37
2.1.12 Zelllinien	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.1 Präparation chemokompetenter Bakterien.....	38
2.2.1.2 Transformation von Bakterien	39
2.2.1.3 Analytische Plasmidisolierung aus Bakterien (Mini-Präparation).....	39
2.2.1.4 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien (Maxi-Präparation).....	39
2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	40
2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	40
2.2.1.8 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
2.2.1.9 Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Fragmenten mittels Klenow.....	41
2.2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.2.1.13 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	43
2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von RNA	43
2.2.1.15 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR).....	43
2.2.1.16 Quantitative RT-PCR mit dem i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System	44
2.2.1.17 Auswertung der quantitativen RT-PCR-Daten	44

2.2.2 Zellkulturmethoden.....	45
2.2.2.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten	45
2.2.2.2 Herstellung von hormonfreiem FCS	45
2.2.2.3 Passagieren von eukaryotischen Zellen.....	46
2.2.2.4 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	46
2.2.2.5 Zellzahlbestimmung mittels Coulter Counter	46
2.2.2.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	47
2.2.2.7 Virale Transduktion eukaryotischer Zellen	48
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.2.3.1 NETN2-Gesamtzellextrakte.....	50
2.2.3.2 Zellextrakte für Reportergergen-Experimente	50
2.2.3.3 Bestimmung der Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität	51
2.2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	52
2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
2.2.3.6 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	54
2.2.3.7 Western-Blot-Analysen und Immunodetektion.....	54
2.2.3.8 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen	55
2.2.3.9 Immunopräzipitation	56
2.2.3.10 Expression von GST-Fusionsproteinen und Herstellung von Rohlysaten.....	57
2.2.3.11 Reinigung und Dialyse von GST-Fusionsproteinen	58
2.2.3.12 Spaltung eines GST-Fusionsproteines durch die TEV-Protease	59
2.2.3.13 Expression, Herstellung von Rohlysaten, Reinigung, Dialyse und TEV-Protease-Spaltung von Poly-His-Fusionsproteinen	60
2.2.3.14 <i>In vitro</i> -Transkription/Translation.....	62
2.2.3.15 GST-Interaktionsstudien.....	62
2.2.3.16 Detektion von ^{35}S -markierten Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen durch Autoradiographie und Fluorographie.....	64
2.2.3.17 Bestimmung der Affinitätskonstanten mittels des BIACORE-Systems ..	64

3. Ergebnisse 67

3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen Mitgliedern der NCoA-Koaktivator-Familie.....	67
3.1.1 Interaktion von NCoA-Proteinen in Zellen.....	67
3.1.2 Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit den Vollängen-Proteinen der NCoA-Proteinfamilie <i>in vitro</i>	68
3.1.3 Koimmunopräzipitation des Vollängen-NCoA-1 durch die NCoA-1- PAS-B-Domäne.....	70
3.1.4 Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit spezifischen LXXLL-Motiven ...	71
3.2 Analyse der PAS-B-Domänen aller NCoA-Proteine	73
3.2.1 Vergleich der Interaktion der PAS-B-Domänen aller NCoA-Familienmitglieder mit allen Vollängen-Proteinen.....	73
3.2.2 Untersuchung der Interaktions-Spezifität der verschiedenen PAS-B-Domänen	75
3.3 Untersuchung der Interaktion zwischen den N-terminalen Domänen von NCoA-1	77
3.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CBP-Interaktions-Domäne	79
3.4.1 Einschränkung der Interaktionsregion in der CID/AD1	79
3.4.2 Konkurrenz der Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 mit LXXLL-Peptiden	81
3.4.3 Konkurrenz-Versuche mit größeren Peptiden	85
3.4.4 Vergleich der CID/AD1 von NCoA-1 und NCoA-3	87
3.4.5 Bestimmung der Affinitätskonstanten.....	89
3.5 Physiologische Bedeutung der identifizierten Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1	91
3.5.1 Effekt der Überexpression der PAS-B-Domäne auf die Interaktion von NCoA-1 und CBP	91
3.5.2 Einfluss der CID1/AD1 auf die Bindung der NCoA-1-PAS-B-Domäne an den Transkriptionsfaktor STAT6.....	93
3.5.3 Effekt der Überexpression von PAS-B-Domänen und der CID/AD1 auf die Transkriptionsaktivierung von nukleären Hormonrezeptoren.....	95

3.5.4 Einfluss der NCoA-1- und NCoA-3-PAS-B-Domäne auf die Androgen-Rezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung in LnCap-Zellen	97
3.5.4.1 Überexpression der NCoA-1- und NCoA-3-PAS-B-Domänen in LnCap-Zellen	97
3.5.4.2 Einfluss der Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 auf die Transkriptionsaktivierung.....	100
4. Diskussion	102
4.1 Die Interaktion von NCoA-Proteinen.....	102
4.2 Bindung der PAS-B-Domänen an die CID/AD1.....	104
4.3 Vergleich der Bindungsspezifitäten der NCoA-Proteine.....	109
4.4 Rolle der PAS-B-CID/AD1-Interaktion bei der Bildung von Koaktivator-Komplexen....	113
4.5 Die Bedeutung der PAS-B-CID/AD1-Interaktion für die Transkriptionsaktivierung	118
5. Zusammenfassung.....	121
6. Abkürzungsverzeichnis	123
7. Literaturverzeichnis	125
8. Anhang	136
8.1 Lebenslauf	136
8.2 Veröffentlichungen	137
8.3 Danksagung.....	138

1. Einleitung

1.1 Regulation der Genexpression

1.1.1 Die basale Transkriptionsaktivierung durch die generelle Transkriptionsmaschinerie

Die Regulation der Genexpression erfolgt auf verschiedenen Ebenen und beginnt mit der Regulation auf Ebene der Transkription. Die Transkription proteinkodierender Gene erfordert neben der RNA-Polymerase II die 6 generellen Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIIF, TFIIE und TFIIH. Diese Faktoren bilden auf der Promotor-Region den so genannten Präinitiationskomplex. *In vitro*-Studien und die Auflösung dreidimensionaler Strukturen konnten den Mechanismus und den vereinfachten schrittweisen Aufbau des Präinitiationskomplexes darstellen (zusammengefasst in Roeder, 1996; Hampsey, 1998; Lee and Young, 2000; Woychik and Hampsey, 2002; Reese, 2003 und Hahn, 2004). Der erste Schritt beim Aufbau der basalen bzw. generellen Transkriptionsmaschinerie und der Initiation der Transkription ist die Bindung der TFIID-Untereinheit TBP (TATA-Box Bindeprotein) an die TATA-Box in der Promotor-Region. Anschließend erfolgt die Stabilisierung dieser Bindung durch TFIIA und die Rekrutierung von TFIIB. TFIIB stabilisiert seinerseits die Bindung von TFIID an den Promotor und rekrutiert den Komplex aus der unphosphorylierten RNA-Polymerase II und TFIIIF. Nach der Rekrutierung von TFIIE und TFIIH kommt es zum TFIIH-katalysierten, ATP-abhängigen Aufschmelzen der DNA in der Promotor-Region. Die Initiation der Transkription endet mit der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II. Dies hat die Lösung der RNA-Polymerase II aus dem Präinitiationskomplex zur Folge und den Übergang in die Elongationsphase der Transkription. Für die Transkriptionsaktivierung *in vivo*, das heißt für die Transkription von in Chromatin verpackten Genen, und die spezifische Regulation der Genexpression werden allerdings weitere Faktoren benötigt. Dazu gehören induzierbare bzw. regulierbare Transkriptionsfaktoren, die an spezifische Erkennungssequenzen in den Promotor-Regionen ihrer Zielgene binden können und die durch sie rekrutierten Koregulatoren (Koaktivatoren und

Korepressoren), die selbst keine DNA-Bindung aufweisen. Die äußeren Einflüsse wirken sich dabei sowohl auf den Aktivitätszustand der Transkriptionsfaktoren, als auch auf die Aktivität und das Gleichgewicht zwischen Koaktivatoren und Korepressoren aus. Dadurch werden die regulativen Einflüsse verschiedenster Signaltransduktionswege integriert und führen durch die Kontaktierung der Transkriptionsfaktoren bzw. der Koaktivatoren zur generellen Transkriptionsmaschinerie zur gezielten und spezifischen Transkriptionsaktivierung

1.1.2 Transkriptionsfaktoren

1.1.2.1 STAT-Proteine

Die Familie der STAT-Proteine (Signal transducer and activator of transcription) besteht aus 7 Mitgliedern: STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6. STAT-Proteine sind latente Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung extrazellulärer Liganden, wie Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren, an die entsprechenden Transmembran-Rezeptoren aktiviert werden. Sie sind an der Regulation verschiedenster physiologischer Prozesse, wie z.B. der Embryonalentwicklung oder der Immunität beteiligt (O'Shea et al., 2002). Der am besten untersuchte Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung von STAT-Proteinen führt, ist der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Abb. 1.1 B). Der Beginn dieser Signaltransduktionskaskade erfolgt durch die Bindung eines extrazellulären Liganden an den entsprechenden Transmembran-Rezeptor. Dies führt zur Dimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der assoziierten JAK (Janus)-Kinasen. Die JAK-Kinasen phosphorylieren sich gegenseitig und die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors an spezifischen Tyrosin-Resten. Diese spezifischen Tyrosin-Reste dienen als Bindestelle für die SH2-Domänen der STAT-Proteine. Nach deren Rekrutierung phosphorylieren die JAK-Kinasen die STAT-Proteine an ihrem spezifischen konservierten Tyrosin-Rest. Die aktivierten STAT-Proteine dimerisieren reziprok über die SH2-Domänen und den phosphorylierten Tyrosinen und translozieren in den

Zellkern. Dort binden die STAT-Dimere an charakteristische DNA-Erkennungssequenzen (GAS (γ -activated sequence)-Elemente), rekrutieren Koaktivatoren und induzieren so die Transkription ihrer Zielgene (Bromberg, 2001; Levy and Darnell, 2002 und Kisseleva et al., 2002).

Alle Mitglieder der STAT-Proteinfamilie besitzen eine ähnliche Struktur mit unterschiedlichen funktionellen Domänen (Abb. 1.1 A, zusammengefasst in Bromberg, 2001; Kisseleva et al., 2002 und Schindler, 2002). Die N-terminale Domäne (NTD) vermittelt die Tetramerisierung, das heißt die Interaktion von STAT-Dimeren, auf Promotoren mit benachbarten Bindungsstellen. Die nachfolgende Coiled-coil-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ermöglicht die Bindung der STAT-Proteine an spezifische DNA-Erkennungssequenzen in der Promotor-Region von Zielgenen. Der DBD folgt die Linker-Domäne, die eine wichtige Funktion für die Struktur der STAT-Proteine besitzt und die Verbindung zur SH2-Domäne herstellt. Die SH2 (Src homology domain 2)-Domäne vermittelt nicht nur die Bindung der STAT-Proteine an die aktivierten Rezeptoren, sondern auch die Dimerisierung der aktivierten STAT-Proteine. Bei allen STAT-Proteinen folgt der SH2-Domäne ein Tyrosin, das bei der Aktivierung der STAT-Proteine phosphoryliert wird. Im C-terminalen Bereich befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD), die für die Transkriptionsaktivierung und die Interaktion mit verschiedenen Koaktivatoren verantwortlich ist.

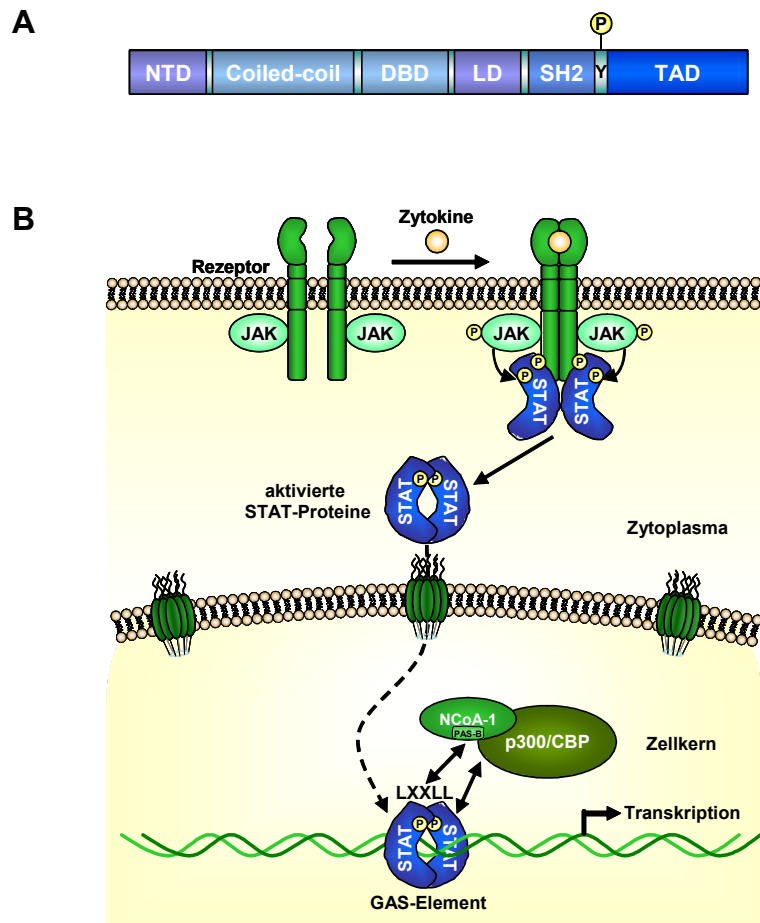


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der STAT-Proteine und des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs

(A) Die Abbildung zeigt schematisch den strukturellen Aufbau der STAT-Proteine. Die N-terminale Domäne (NTD), die Coiled-coil-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Linker-Domäne (LD), die SH2-Domäne (SH2), der konservierte Tyrosin-Rest (Y) und die Transaktivierungsdomäne (TAD) sind dargestellt. (B) Schematische Darstellung der Aktivierung der STAT-Proteine durch den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Die Bindung eines extrazellulären Liganden (z.B. ein Zytokin) an einen spezifischen Rezeptor führt zur Aktivierung des Rezeptors, sowie der assoziierten Janus-Kinasen (JAK). Nach der Rekrutierung und Aktivierung der STAT-Proteine erfolgt deren Dimerisierung und Translokation in den Zellkern. Dort binden die aktivierten STAT-Proteine spezifische DNA-Erkennungssequenzen (GAS-Elemente) im Promotor ihrer Zielgene und aktivieren deren Transkription.

1.1.2.2 Nukleäre Hormonrezeptoren

Nukleäre Hormonrezeptoren bilden eine Familie ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren, die durch die spezifische Regulation ihrer Zielgene an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie z.B. der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung beteiligt sind (Mangelsdorf et al., 1995 und Aranda and Pascual, 2001). Zu den nukleären Hormonrezeptoren gehören neben der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren (z.B. der Östrogen-Rezeptor und

Androgen-Rezeptor) unter anderem der Thyreoidhormon-Rezeptor, der Retinsäure-Rezeptor, der Vitamin D-Rezeptor, sowie die Gruppe der so genannten „Orphan Receptors“, von denen zunächst oftmals keine Liganden bekannt sind. Alle nukleären Hormonrezeptoren besitzen eine moduläre Struktur aus verschiedenen funktionellen Domänen (Abb. 1.2 A; zusammengefasst in Rollerova and Urbancikova, 2000 und Novac and Heinzl, 2004). Die N-terminale A/B-Domäne beinhaltet die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), die die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen durch die Interaktion mit Koregulatoren vermittelt. Diese Domäne variiert in der Größe und der Aminosäure-Sequenz am stärksten zwischen den verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist die am höchsten konservierte Domäne und ermöglicht die Bindung der Rezeptoren an spezifischen DNA-Erkennungssequenzen in den Promotor-Regionen ihrer Zielgene. Außerdem ist diese Domäne auch an der Dimerisierung der Rezeptoren beteiligt. Die nachfolgende Hinge-Domäne ist wichtig für die Flexibilität der Rezeptoren bei Konformationsänderungen und enthält oft ein Kernlokalisierungssignal. Die C-terminale Region enthält die Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Die LBD umfasst die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2), vermittelt die Dimerisierung und die Interaktion mit Koregulatoren. Schließlich folgt noch bei einigen nukleären Hormonrezeptoren die F-Domäne, die eine Funktion bei der Transaktivierung besitzt. Die durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung wird im Folgenden am Beispiel der Steroidhormonrezeptoren erklärt. Vor Bindung der Steroidhormone liegt der inaktive Rezeptor in einem Komplex mit Hitzeschockproteinen (z.B. Hsp90) vor. Nach Bindung des Steroidhormons dissoziiert dieser Komplex, der Rezeptor dimerisiert, bindet an spezifische DNA-Sequenzen, den so genannten „hormone responsive elements“ (HRE) in der Promotor-Region von Zielgenen und aktiviert durch die Rekrutierung von Koaktivatoren deren Transkription (Abb. 1.2 B) (zusammengefasst in Tsai and O'Malley, 1994 und Bain et al., 2007).

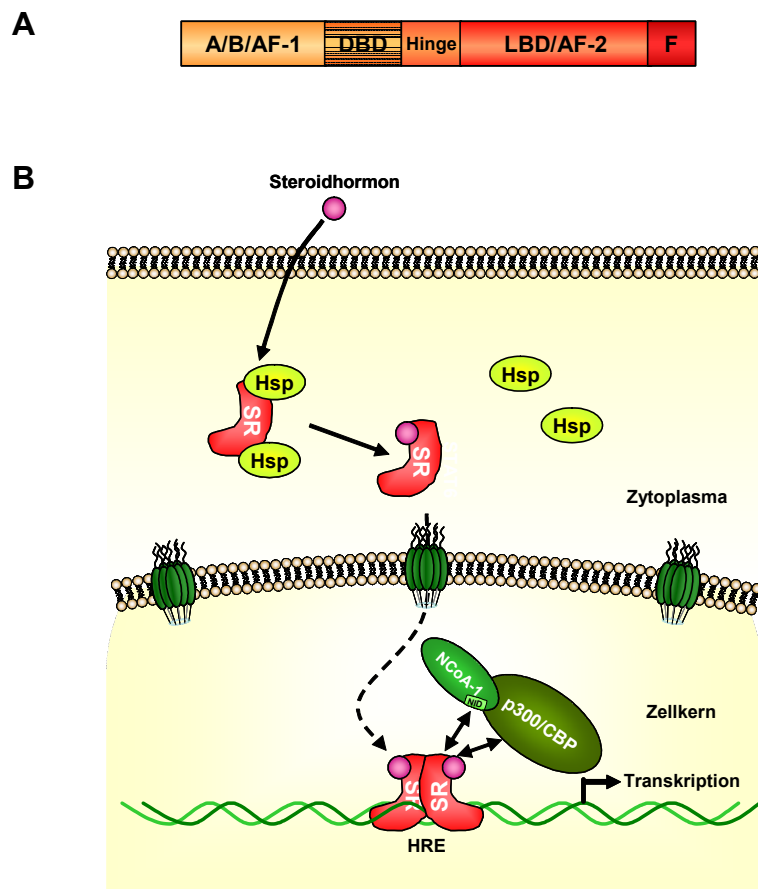


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Struktur der nukleären Hormonrezeptoren und vereinfachtes Modell der transkriptionellen Aktivierung durch Steroidhormonrezeptoren

(A) Nukleäre Hormonrezeptoren sind aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut. Nach der N-terminalen A/B-Domäne (A/B), die die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) vermittelt, folgt die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Hinge-Domäne, die Liganden-Bindungsdomäne (LBD), die die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) beinhaltet und die F-Domäne (F). (B) Die Bindung eines Steroidhormones an den entsprechenden Steroidhormonrezeptor (SR) führt zur Dissoziation der Hitzeschockproteine (Hsp) vom Rezeptor. Der aktivierte Steroidhormonrezeptor dimerisiert und bindet an spezifische DNA-Erkennungssequenzen (HRE: hormone responsive element) in der Promotor-Region seiner Zielgene. Durch die Rekrutierung von Koaktivatoren, wie NCoA-Proteinen und p300/CBP, erfolgt dann die Transkriptionsaktivierung.

1.2 Koaktivatoren

1.2.1 Rolle von Koaktivatoren bei der Genexpression

Koaktivatoren werden durch Transkriptionsfaktoren zu Ziel-Promotor- und Enhancer-Regionen rekrutiert und ermöglichen so die Transkriptionsaktivierung. Die Koaktivator-Proteine sind in großen Multiprotein-Koaktivator-Komplexen

assoziiert. Sie besitzen verschiedene Domänen und Motive für multiple Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren oder anderen Koaktivatoren und enthalten diverse enzymatische Funktionen. Die Koaktivatoren modifizieren kovalent Histone oder andere Koaktivatoren, z.B. durch Acetylierungen oder Methylierungen, sorgen für die ATP-abhängige Chromatin-Remodellierung, rekrutieren selbst sekundäre Koaktivatoren oder fungieren als Brückenproteine zur generellen Transkriptionsmaschinerie (zusammengefasst in McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002 und Lonard and O'Malley, 2005 und 2006). Die Modifikation der Chromatin-Struktur ermöglicht die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren, sowie basaler Transkriptionsfaktoren, führt zur Bildung des Präinitiationskomplexes und damit letztlich zur Aktivierung der Transkription. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen variieren Koaktivatoren daher in ihren Domänen und ihrer Struktur. Beim geordneten und mehrstufigen Prozess der Rekrutierung von Koaktivatoren (siehe Abschnitt 1.2.7) zeigen sich spezifische, aber auch redundante Funktionen von Gruppen von Koaktivatoren mit gleichen enzymatischen Aktivitäten (Shang et al., 2000; Metivier et al., 2003 und Li et al., 2003). Die Fähigkeit vieler Koaktivatoren mit vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu interagieren und bei diesen die Transkriptionsaktivierung zu vermitteln, legt nahe, dass Koaktivatoren limitierende Faktoren darstellen, um die die Transkriptionsfaktoren kompetieren. Eine solche Competition wurde z.B. bei CREB, AP-1 und verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren um CBP und beim Glucocorticoid-Rezeptor und NF- κ B um NCoA-1 bzw. NCoA-3 postuliert (Kamei et al., 1996; Sheppard et al., 1998 und Werbajh et al., 2000). Neben diesem molekularen Mechanismus der Competition führt die vielseitige Fähigkeit von Koaktivatoren zu Interaktionen, jedoch auch zur Integration verschiedener Signaltransduktionswege und damit verschiedener äußerer Stimuli für spezifische zelluläre Reaktionen, das heißt spezifische Genexpressionsmuster. Dabei spielen posttranslationale Modifikationen von Koaktivatoren eine wichtige Rolle. Signaltransduktionskaskaden, die durch Wachstumsfaktoren induziert werden, können zu sekundären Modifikationen von Koaktivatoren führen und dadurch die durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung regulieren (Lonard and O'Malley, 2005). So ist die durch MAP (Mitogen-activated protein)-Kinasen induzierte Phosphorylierung von NCoA-3

entscheidend für die Aktivität als Koaktivator für nukleäre Hormonrezeptoren (Wu et al., 2004). Koaktivatoren sind wichtige Faktoren bei der Regulation und Modulation der Genexpression und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse.

1.2.2 Familie der NCoA/SRC-Koaktivatoren

Die Mitglieder der Familie der NCoA (Nuclear receptor coactivator)- oder SRC (Steroid receptor coactivator)-Proteine wurden zuerst als Koaktivatoren von nukleären Hormonrezeptoren identifiziert. Die Familie besteht aus drei homologen Mitgliedern: NCoA-1 (SRC-1), NCoA-2 (SRC-2, GRIP1 oder TIF2) und NCoA-3 (p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1 oder TRAM-1). NCoA-Proteine haben eine Größe von etwa 160 kDa bei einer Sequenzähnlichkeit von 50-55% und Sequenzidentität von 43-48% zwischen den drei Mitgliedern der Koaktivator-Familie. Der strukturelle Aufbau der NCoA-Proteine ist konserviert und besteht aus mehreren funktionellen Domänen (siehe Abb.1.3).

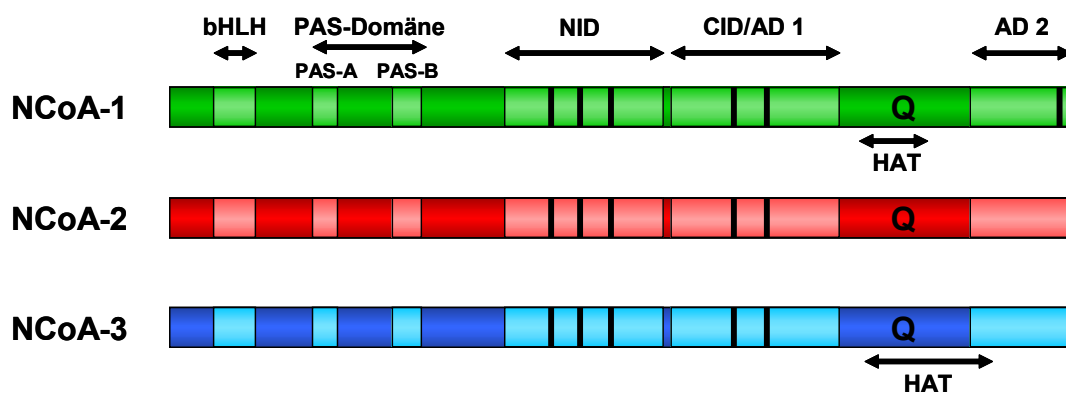


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Aufbaus der NCoA-Proteine

Die verschiedenen funktionellen Domänen der drei NCoA-Familienmitglieder sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die basic-Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH), die PAS-Domäne, die Nuclear-Receptor-Interaction-Domäne (NID), die erste Transaktivierungsdomäne, die die Interaktion mit p300/CBP vermittelt (CID/AD1), die glutaminreiche Region (Q) und die zweite Transaktivierungsdomäne (AD2) sind dargestellt. Die Pfeile unterhalb von NCoA-1 und NCoA-3 zeigen die Regionen, die eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) aufweisen. Die schwarzen Balken markieren LXXLL-Motive bzw. LXXLL-ähnliche Motive.

Der Bereich der bHLH/PAS-Domänen ist dabei die am höchsten konservierte Region. bHLH (basic-Helix-Loop-Helix)-Domänen sind in vielen Transkriptionsfaktoren vorhanden, in denen sie DNA-Bindung und Dimerisierung vermitteln. Die nachfolgende PAS (Per/ARNT/Sim)-Domäne besteht aus zwei PAS-Domäne-Regionen (PAS-A- und PAS-B-Domäne). PAS-Domänen konnten ebenso in vielen verschiedenen Signaltransduktionsmolekülen gefunden werden. Dort vermitteln sie unter anderem Protein-Protein-Interaktionen und Dimerisierungen (siehe auch Abschnitt 1.4). Die Funktion der bHLH/PAS-Region in NCoA-Proteinen ist bislang jedoch weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die N-terminale Region von z.B. GRIP1 unter anderem die Interaktion mit den Koaktivatoren CoCoA und GAC63 vermittelt (Kim et al., 2003 und Chen et al., 2005) und dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 für die Interaktion mit STAT6 verantwortlich ist (Litterst and Pfitzner, 2001 und 2002 und Razeto et al., 2004). Außerdem wurde in verschiedenen Publikationen spekuliert, dass Mitglieder der NCoA-Familie in der Lage sind miteinander durch ihre N-terminale bHLH/PAS-Domänen-Region zu interagieren (McKenna et al., 1998 und Zhang et al., 2004b). Eine direkte Interaktion zwischen Mitgliedern der NCoA-Familie über die aminoterminalen Regionen konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

Die zentral gelegene Nuclear-Receptor-Interaction-Domäne (NID) vermittelt die ligandenabhängige direkte Interaktion mit nukleären Hormonrezeptoren. Diese Domäne enthält drei so genannte LXXLL-Motive (dabei steht L für die Aminosäure Leucin und X für eine beliebige andere Aminosäure), die für die Bindung an die nukleären Hormonrezeptoren verantwortlich sind (Heery et al., 1997; Torchia et al., 1997 und Ding et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die drei LXXLL-Motive in unterschiedlichen Kombinationen und zu einem unterschiedlichen Ausmaß für die Interaktion mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren benötigt werden (Torchia et al., 1997; Ding et al., 1998; Leers et al., 1998 und McInerney et al., 1998). Anschließend an die NID besitzen NCoA-Proteine zwei Transaktivierungsdomänen (AD1 und AD2). Die AD1-Region wird auch als CBP-Interaktions-Domäne (CID) bezeichnet, da sie die Interaktion mit den Koaktivatoren p300/CBP vermittelt (Yao et al., 1996; Chen et al., 1997; Torchia et al., 1997 und Kalkhoven et al., 1998). Diese Domäne enthält zwei LXXLL-Motive bzw. LXXLL-ähnliche Motive, die für den

Kontakt zu p300/CBP verantwortlich sind (Voegel et al., 1998 und McInerney et al., 1998). Die zweite Transaktivierungsdomäne befindet sich am C-Terminus. Die AD2-Region vermittelt die Interaktion mit den Histon-Methyltransferasen (HMT) CARM1 und PRMT1 (Chen et al., 1999a und Koh et al., 2001) und ermöglicht dadurch deren Rekrutierung zu den Koaktivator-Komplexen. Neben den LXXLL-Motiven in der Nuclear-Receptor-Interaction- und der CBP-Interaktions-Domäne besitzt NCoA-1, als einziges Mitglied der NCoA-Familie, ein weiteres LXXLL-Motiv in der C-terminalen Region. Zusätzlich dazu konnte demonstriert werden, dass die C-terminalen Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 eine intrinsische Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität besitzen, die jedoch im Vergleich zu anderen HAT's, wie z.B. p300/CBP, nur sehr schwach ist (Spencer et al., 1997 und Chen et al., 1997). Die Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie spielen nicht nur eine Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung durch viele nukleäre Hormonrezeptoren (zusammengefasst in Xu and O'Malley, 2002 und Xu and Li, 2003), sondern auch bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. STAT-Proteinen (z.B. STAT5 (Litterst et al., 2003) und STAT6 (Litterst and Pfitzner, 2001 und 2002)), AP1 (Lee et al., 1998) und NF- κ B (Na et al., 1998 und Werbajh et al., 2000).

Die Funktion der NCoA-Proteine liegt in der Rekrutierung von weiteren Koaktivatoren, die eine HAT-Aktivität (wie z.B. p300, CBP und pCAF) und eine HMT-Aktivität (wie z.B. CARM1 und PRMT1) besitzen und die Modifikation des Chromatins und damit die Transkriptionsaktivierung ermöglichen. Außerdem wurde für NCoA-1 die Interaktion mit den generellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFIIB (Takeshita et al., 1996) beschrieben. Die Funktion dieser Interaktion ist jedoch noch ungeklärt.

Alle NCoA-Familienmitglieder werden in vielen verschiedenen Gewebe- und Zelltypen exprimiert (zusammengefasst in Xu and O'Malley, 2002 und Xu and Li, 2003). Jedoch zeigen die NCoA-Proteine teilweise unterschiedliche gewebe- und zelltypspezifische Expressionsprofile. Diese Unterschiede führen wahrscheinlich unter anderem, trotz der ähnlichen Eigenschaften und der Fähigkeit die Transkriptionsaktivierung vieler verschiedener nukleärer Hormonrezeptoren gleichermaßen stark zu vermitteln, zu spezifischen Funktionen. So wurde postuliert, dass bestimmte nukleäre Hormonrezeptoren bevorzugt mit bestimmten NCoA-Proteinen interagieren und die Transkription

aktivieren. Dabei zeigen sich zelltypunabhängig unterschiedliche Spezifitäten bzw. Präferenzen der NCoA-Proteine für die Interaktion mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren (Ding et al., 1998; Suen et al., 1998 und Li et al., 2003). Aber auch die unterschiedlichen Phänotypen der verschiedenen „Knockout“-Mäuse deuten spezifische Funktionen an (siehe auch folgende Abschnitte). Neben den unterschiedlichen Expressionsprofilen scheinen aber auch die Unterschiede in der Struktur der drei NCoA-Proteine und posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen (Rowan et al., 2000; Lopez et al., 2001 und Wu et al., 2004) oder Sumoylierungen (Kotaja et al., 2002; Chauchereau et al., 2003 und Wu et al., 2006) bei den spezifischen Funktionen eine Rolle zu spielen. Andererseits existiert auch eine gewisse funktionelle Redundanz. So zeigen die entsprechenden „Knockout“-Mäuse teilweise auch die erhöhte Expression eines anderen NCoA-Familienmitgliedes in bestimmten Geweben (Xu et al., 1998; Wang et al., 2000 und Apostolakis et al., 2002). Aus diesem Grund und wegen des teilweise überlappenden Expressionsmusters in einigen Geweben, liegt es nahe, dass NCoA-Proteine zumindest teilweise dazu in der Lage sind den Ausfall eines anderen NCoA-Proteines zu kompensieren und die gleichen biologischen Funktionen zu vermitteln.

1.2.3 NCoA-1 (SRC-1)

NCoA-1 (SRC-1) war das erste Mitglied der NCoA/SRC-Koaktivator-Familie das entdeckt wurde (Onate et al., 1995). Zwei Isoformen von NCoA-1 (SRC-1a und SRC-1e), die sich durch den C-Terminus unterscheiden und vermutlich eine unterschiedliche Rolle bei der Östrogen-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung spielen, konnten identifiziert werden (Kalkhoven et al., 1998). Dabei enthält SRC-1a in der carboxyterminalen Region, im Gegensatz zu NCoA-2 und NCoA-3, ein weiteres LXXLL-Motiv, das die ligandenabhängige Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren vermitteln kann (Heery et al., 1997; Torchia et al., 1997; Ding et al., 1998 und Kalkhoven et al., 1998). Ferner wurde postuliert, dass zusätzlich eine weitere C-terminale Region die Interaktion zur

A/B-Domäne des Androgen-Rezeptors und eine daraus resultierende Koaktivierung vermittelt (Ma et al., 1999). Studien mit Mäusen, die kein funktionelles NCoA-1 besitzen („Knockout“-Mäuse; NCoA-1^{-/-}), haben ein normales Wachstum und eine normale Fruchtbarkeit (Xu et al., 1998). Jedoch zeigen NCoA-1^{-/-}-Mäuse eine partielle Resistenz gegenüber verschiedenen Hormonen (Androgen, Progesteron, Östrogen und Thyreoidhormon) und ein reduziertes Wachstum von Zielorganen einiger Steroidhormone, wie z.B. der Prostata oder der Gebärmutter. Weiterhin deuten die Ergebnisse eine Funktion von NCoA-1 bei der Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüse an (Xu et al., 1998 und Weiss et al., 1999). Diese Beobachtungen und die vielfältigen Interaktionen von NCoA-1 mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren lassen daher auf eine wichtige Funktion von NCoA-1 als Koaktivator bei der Transkriptionsaktivierung verschiedener nukleärer Hormonrezeptoren schließen. In diesem Zusammenhang konnte durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden auch eine wichtige Rolle von NCoA-1 bei der Entwicklung des Gehirnes und dem Fortpflanzungsverhalten von Ratten und Mäusen aufgezeigt werden (Auger et al., 2000 und Apostolakis et al., 2002). Inwieweit neben der Rekrutierung weiterer Koaktivatoren (siehe Abschnitt 1.2.2), die eigene HAT-Aktivität in der carboxyterminalen Region von NCoA-1 eine Rolle bei der Funktion als Koaktivator spielt, ist allerdings unklar (Spencer et al., 1997).

1.2.4 NCoA-2 (SRC-2, GRIP1 oder TIF2)

NCoA-2 wurde als Interaktionspartner des Glucocorticoid- und des Östrogen-Rezeptors identifiziert (Hong et al., 1996 und Voegel et al., 1996). Neben der Bezeichnung SRC-2 ist NCoA-2 daher auch als GRIP1 (Glucocorticoid receptor-interacting protein 1) und TIF2 (Transcriptional intermediary factor 2) bekannt. Ähnlich wie die anderen Mitglieder der NCoA/SRC-Koaktivator-Familie fungiert NCoA-2 als Koaktivator durch die Interaktion mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren. Dabei zeigte sich, wie bei NCoA-1, dass NCoA-2 zusätzlich zur ligandenabhängigen Interaktion der NID mit der LBD/AF-2, auch über eine C-terminale Region mit der A/B-Domäne einiger nukleärer

Hormonrezeptoren interagieren und diese koaktivieren kann (Webb et al., 1998 und Ma et al., 1999). Die spezifischen Funktionen von NCoA-2 wurden durch Studien mit NCoA-2^{-/-}-Mäusen untersucht (Gehin et al., 2002 und Picard et al., 2002). NCoA-2-„Knockout“-Mäuse zeigen ein annähernd normales körperliches Wachstum. Jedoch ist die Fruchtbarkeit in männlichen und weiblichen Tieren deutlich herabgesetzt (Hypofertilität) (Gehin et al., 2002). Ferner führte die Depletion von NCoA-2 mit Antisense-Oligonukleotiden zu einer Beeinträchtigung des Fortpflanzungsverhaltens bei normalen weiblichen Ratten und Mäusen (Apostolakis et al., 2002). Dies deutet auf eine wichtige Rolle von NCoA-2 bei den Fortpflanzungsfunktionen und dem Verhalten hin. Durch die Funktion als Koaktivator vom PPAR_γ-Rezeptor spielt NCoA-2 auch eine entscheidende Rolle beim Lipid-Stoffwechsel und dem Gleichgewicht des Energiehaushaltes (Picard et al., 2002). NCoA-2^{-/-}-Mäuse sind gegen Fettleibigkeit geschützt und zeigen eine verstärkte adaptive Thermogenese. Dabei ist auch das relative Verhältnis von NCoA-2 zu NCoA-1 für den Energiestoffwechsel entscheidend. Neuere Studien konnten jedoch auch für NCoA-1 und NCoA-3 wichtige Funktionen bei der Regulation des Energiehaushaltes aufzeigen (Wang et al., 2006). Im Gegensatz zu den anderen NCoA-Familienmitgliedern besitzt NCoA-2 keine HAT-Aktivität im C-Terminus. Jedoch konnte gezeigt werden, dass GRIP1 über die carboxyterminale Region zumindest homodimerisieren kann und eine Repressionsdomäne beinhaltet (Liu et al., 2006). Die C-terminale Region scheint dabei als Bindungsregion für Korepressoren zu fungieren. Die intra- bzw. intermolekulare Interaktion von GRIP1 und die Interaktion mit anderen Faktoren (z.B. HDAC1 oder CARM1) könnte somit zu Konformationsänderungen führen und damit zur Regulation der eigenen Funktionen als Koaktivator.

1.2.5 NCoA-3 (p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1 oder TRAM-1)

NCoA-3 (SRC-3) wurde von sechs verschiedenen Gruppen beschrieben und hat daher verschiedene Namen: p/CIP (p300/CBP/co-integrator-associated protein) (Torchia et al., 1997), RAC3 (Receptor-associated coactivator 3) (Li et al., 1997), ACTR (Activator of thyroid and retinoic acid receptors) (Chen et al., 1997), AIB1 (Amplified in breast cancer-1) (Anzick et al., 1997) und TRAM-1 (Thyroid hormone receptor activator molecule-1) (Takeshita et al., 1997). Im humanen Genom befindet sich NCoA-3 in einer bei verschiedenen Krebsarten häufig amplifizierten chromosomalen Region (20q12) (Anzick et al., 1997). Daher liegt NCoA-3 bei vielen Krebsarten amplifiziert und überexprimiert vor (siehe auch Abschnitt 1.2.6 und Tabelle 1.1). Ebenso wie NCoA-1 besitzt NCoA-3 in der C-terminalen Region eine HAT-Aktivität (Chen et al., 1997), deren Bedeutung für die Transaktivierung bisher jedoch auch ungeklärt ist. Im Gegensatz zu NCoA-1- und NCoA-2-„Knockout“-Mäusen zeigen NCoA-3-„Knockout“-Mäuse (NCoA-3^{-/-}) einen sehr ausgeprägten Phänotyp (Xu et al., 2000 und Wang et al., 2000). NCoA-3^{-/-}-Mäuse sind im Wachstum gehemmt und ausgewachsene Mäuse haben ein geringeres Körpergewicht. Neben der Bedeutung von NCoA-3 für ein normales Wachstum, zeigt sich außerdem eine besondere Rolle von NCoA-3 für das weibliche Fortpflanzungssystem (Xu et al., 2000). Während es in der Entwicklung und Funktion stark gestört ist, sind die Fortpflanzungsorgane bei Männchen nur leicht beeinträchtigt (Xu and Li, 2003). Zusätzlich konnte auch noch eine gestörte Entwicklung der Brustdrüsen festgestellt werden (Xu et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass sich die physiologischen Funktionen von NCoA-3 zu denen der anderen NCoA-Proteine unterscheiden. Des Weiteren fungiert NCoA-3 als Interaktionspartner und Koaktivator von NF-κB (Werbajh et al., 2000) und verstärkt die durch NF-κB-vermittelte Genexpression (Wu et al., 2002). Daher spielt NCoA-3 wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei durch NF-κB-vermittelten Prozessen.

1.2.6 Rolle von NCoA-Proteinen bei pathologischen Abweichungen

Aufgrund der Funktion der Koaktivatoren bei der Transkriptionsaktivierung und Regulation der Genexpression, können Abweichungen, die die Funktion oder Expression eines NCoA-Proteines betreffen, zu Erkrankungen führen. Dabei gibt es verschiedene Erscheinungsformen von NCoA-bezogenen Krankheiten (siehe Tabelle 1.1). Bei vielen verschiedenen Krebsarten (Tumore und Zelllinien) wurde eine Amplifikation und/oder Überexpression von NCoA-Proteinen nachgewiesen. Dies zeigte sich sowohl bei hormonabhängigen, als auch bei hormonunabhängigen Tumoren. Vor allem NCoA-3 liegt in vielen verschiedenen Krebsarten (z.B. Brust-, Eierstock- oder Prostatakrebs) amplifiziert und/oder überexprimiert vor. Es konnte in einigen Fällen eine Korrelation zwischen der Amplifikation und/oder Überexpression von NCoA-3 und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, sowie einer schlechten Prognose für den Patienten gezeigt werden (Sakakura et al., 2000; Tanner et al., 2000; Gnanapragasam et al., 2001 und Wang et al., 2002). Neben der Amplifikation und/oder Überexpression können aber auch Abweichungen im Gen bzw. Protein selbst für pathologische Veränderungen verantwortlich sein. Dies betrifft z.B. verschiedene Splice-Varianten eines Proteines. So könnte die Überexpression einer Splice-Variante von NCoA-3, die ein stärkerer Koaktivator als das Vollängen-Protein ist, bei Brustkrebs für das Fortschreiten und die Entwicklung bei bestimmten Fällen dieser Krebserkrankung eine wichtige Rolle spielen (Reiter et al., 2001). Aber auch Polymorphismen, wie z.B. unterschiedlich lange Poly-Glutamin-Regionen von NCoA-3 scheinen beim Fortschreiten und bei der Prognose von Eierstockkrebs (Li et al., 2005) und Prostatakrebs (Hsing et al., 2002) relevant zu sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von Fusionsproteinen durch chromosomale Translokationen. Dies konnte vor allem bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) gezeigt werden. Dabei konnte ein Fusionsprotein von MOZ (Monocytic leukemia zinc finger protein) und NCoA-2 nachgewiesen werden, das für das Fortschreiten der Krebserkrankung eine wichtige Rolle spielt (Carapeti et al., 1998 und Liang et al., 1998). Neben diesen, direkt durch NCoA-Proteine verursachten oder im Verlauf verstärkten Erkrankungen, gibt es jedoch auch die Möglichkeit, dass NCoA-Proteine indirekt bei Erkrankungen beteiligt sein könnten. Solche

indirekten Auswirkungen können vorliegen, wenn z.B. Transkriptionsfaktoren Mutationen aufweisen und ihre normale Struktur und Funktionalität verlieren, indem eine Bindung von Koaktivatoren nicht mehr möglich ist. Dies könnte z.B. bei der Spinobulbären Muskeldystrophie (Kennedys Disease) der Fall sein. Dabei liegt eine Mutation des Androgen-Rezeptors vor, die zu einer Verlängerung der Poly-Glutamin-Region im N-Terminus führt. Die Interaktion mit den NCoA-Proteinen wird verringert und dies könnte die Transkriptionsaktivierung der Zielgene vermindern (Irvine et al., 2000).

Durch den Einfluss der Koaktivatoren, wie den NCoA-Proteinen, auf die Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen, spielen sie eine wichtige Rolle bei verschiedensten Krankheiten. Daher stellen sich NCoA-Proteine einerseits als wichtige prognostische Marker für eine weiterführende und gezielte Behandlung dar, aber auch als direkte Angriffspunkte für eine Therapie.

Krankheit	Defekt/Abweichung	Referenz
NCoA-1		
Prostatakrebs	Überexpression	Gregory et al., 2001 Agoulnik et al., 2005
Meningiom	Abweichende Expression	Carroll et al., 2000
Rhabdomyosarkom	Fusionsprotein PAX3-NCoA-1	Wachtel et al., 2004
Spinobulbäre Muskeldystrophie (Kennedys Disease)	Veränderte Bindungsaffinität zum Androgen-Rezeptor	Irvine et al., 2000
NCoA-2		
Prostatakrebs	Überexpression	Gregory et al., 2001 Agoulnik et al., 2006
Leukämie (AML)	Fusionsprotein MOZ-TIF2	Carapeti et al., 1998 Liang et al., 1998
Meningiom	Abweichende Expression	Carroll et al., 2000
Spinobulbäre Muskeldystrophie (Kennedys Disease)	Veränderte Bindungsaffinität zum Androgen-Rezeptor	Irvine et al., 2000
NCoA-3		
Brustkrebs	Amplifikation, Überexpression	Anzick et al., 1997
	Amplifikation	Bautista et al., 1998
	Überexpression	List et al., 2001
	Überexpression einer Splice-Variante	Reiter et al., 2001
Eierstockkrebs	Amplifikation, Überexpression	Anzick et al., 1997
	Amplifikation	Bautista et al., 1998 Tanner et al., 2000
	Länge der Poly-Glutamin-Region	Li et al., 2005
Endometriumkarzinom	Amplifikation, Überexpression	Glaeser et al., 2001
Prostatakrebs	Überexpression	Gnanapragasam et al., 2001 Zhou et al., 2005
	Länge der Poly-Glutamin-Region	Hsing et al., 2002
Meningiom	Überexpression	Carroll et al., 2000
Bauchspeicheldrüsenkrebs	Amplifikation, Überexpression	Ghadimi et al., 1999 Henke et al., 2004
Magenkrebs	Amplifikation, Überexpression	Sakakura et al., 2000
Darmkrebs	Amplifikation, Überexpression	Xie et al., 2005
Hepatozelluläres Karzinom	Amplifikation	Wang et al., 2002
Spinobulbäre Muskeldystrophie (Kennedys Disease)	Veränderte Bindungsaffinität zum Androgen-Rezeptor	Irvine et al., 2000

Tabelle 1.1 Abweichungen von NCoA-Proteinen bei verschiedenen Krankheiten

Die Tabelle ist basierend auf Yanase et al., 2004 und wurde weiterführend ergänzt.

1.2.7 Rekrutierung von Koaktivatoren

Die Rekrutierung von Koaktivatoren spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkriptionsaktivierung und damit auch bei der Genexpression. Vor allem bei den nukleären Hormonrezeptoren wurden die Mechanismen und die Abfolge der Rekrutierung untersucht und führten zu verschiedenen Modellen (Shang et al., 2000; Dilworth and Chambon, 2001; Shang et al., 2002; Metivier et al., 2003; Wang et al., 2005 und Lonard and O'Malley, 2005). Durch die verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass die Rekrutierung der Koaktivatoren ein dynamischer, geordneter und sequentieller, in Zyklen ablaufender, Prozess ist. Es wurde postuliert, dass neben einer bestimmten Reihenfolge der Rekrutierung, auch die Zusammensetzung der Koaktivator-Komplexe unterschiedlich sein kann (McKenna and O'Malley, 2002 und Li et al., 2003). Die kombinatorische Rekrutierung der verschiedenen Koaktivatoren basiert dabei auf der teilweise vorhandenen funktionellen Redundanz innerhalb der verschiedenen Gruppen von Koaktivatoren mit gleichen enzymatischen Funktionen, wie z.B. einer HAT- oder HMT-Aktivität. Jedoch zeigt sich auch eine spezifische Rekrutierung bestimmter Faktoren, die essentiell sind (Korzus et al., 1998; Metivier et al., 2003 und Li et al., 2003). Ferner existieren nicht nur Unterschiede zwischen den verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren, sondern auch liganden-, promotor- und zelltypspezifische Unterschiede (Takeyama et al., 1999; Shang and Brown, 2002 und Zhang et al., 2004b). Die folgende Reihenfolge der Rekrutierungsprozesse stellt daher nur exemplarisch und stark vereinfacht die Abfolge für einige Promotoren dar (siehe auch Abb. 1.4).

Nach der Bindung der aktivierten nukleären Hormonrezeptoren an die DNA, kommt es zunächst zur Rekrutierung von ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierungs-Komplexen (z.B. ISWI oder SWI/SNF). Diese ermöglichen durch den lokalen Umbau des Chromatins die nachfolgende Rekrutierung von unter anderem den Koaktivatoren p300/CBP und Mitgliedern der NCoA-Familie. Dabei sorgen die Histon-Acetyltransferasen (p300/CBP, aber auch p/CAF) für die Acetylierung der Histone und anderer Proteine und bewirken so die weitere Öffnung des Promotors. Die Rolle der NCoA-Proteine liegt dabei in der Rekrutierung von weiteren Koaktivatoren und der Stabilisierung der Interaktion

der nukleären Hormonrezeptoren und p300/CBP (Li et al., 2000; Sheppard et al., 2001 und Shang et al., 2002). Zusätzlich werden auch Histon-Methyltransferasen (z.B. CARM1 und PRMT1) rekrutiert, die durch die Methylierung der Histone die Transkriptionsaktivierung unterstützen (Chen et al., 1999a; Chen et al., 2000 und Lee et al., 2002). Anschließend kommt es zu einer Lösung des p300/CBP/HMT/NCoA-Koaktivator-Komplexes von den nukleären Hormonrezeptoren. Dabei wird vermutet, dass eine Acetylierung von NCoA-Proteinen durch p300, die Interaktion der NCoA-Proteine mit den nukleären Hormonrezeptoren destabilisiert und damit zur Dissoziation des Koaktivator-Komplexes führt (Chen et al., 1999b). Gleichzeitig könnte auch die Methylierung von NCoA-Proteinen durch CARM1 zur Dissoziation des Komplexes beitragen (Feng et al., 2006 und Naeem et al., 2007). Dies ermöglicht die Bindung des TRAP/DRIP/Mediator-Komplexes an die nukleären Hormonrezeptoren, der seinerseits für die Rekrutierung des RNA-Polymerase II-Holoenzym sorgt und damit die basale Transkriptionsmaschinerie kontaktiert. Die nachfolgende Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes zur Promotor-Region führt wiederum zu einem Chromatin-Umbau und ermöglicht die Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren. Die Bildung des Präinitiationskomplexes führt dann letztlich zur Initiation der Transkription. Anschließend erfolgt die durch proteasomalen Abbau und posttranslationale Modifikationen (siehe oben) gesteuerte Dissoziation und die erneute sequentielle Assoziation des Transkriptionsfaktor-Koaktivator-Komplexes vom bzw. an den Promotor. Dadurch wird die präzise und flexible Regulation der Genexpression durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit des aktivierenden Liganden ermöglicht (Metivier et al., 2003; Reid et al., 2003; Lonard and O'Malley, 2005 und Perissi and Rosenfeld, 2005).

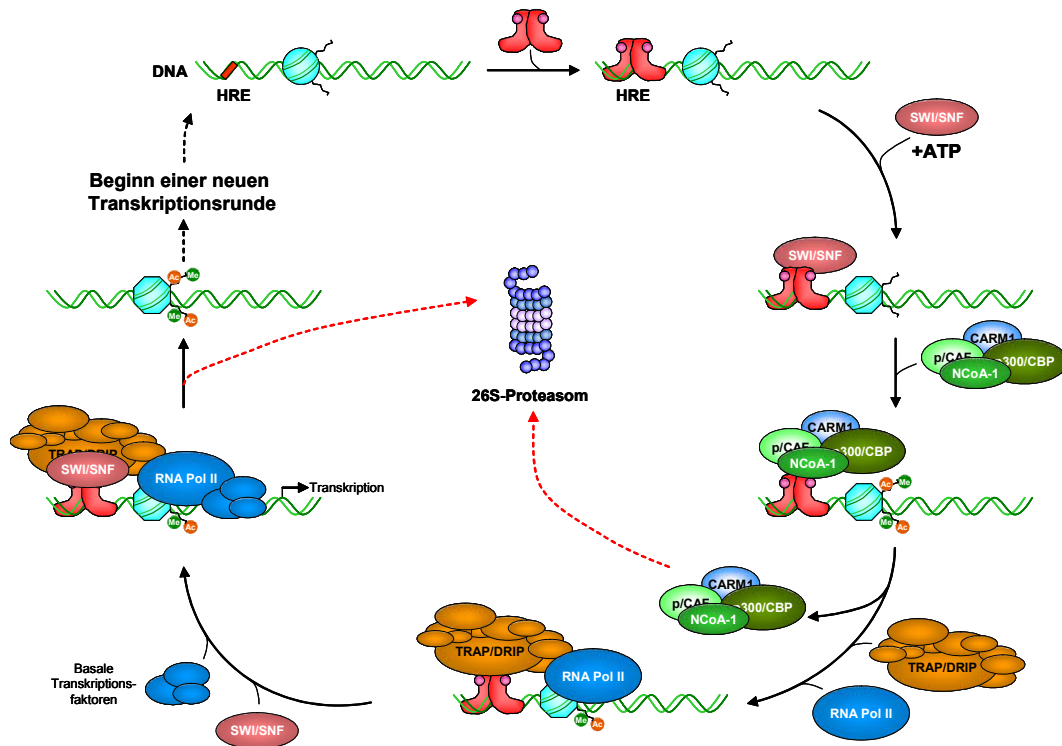


Abb. 1.4 Vereinfachtes Modell der zyklischen Rekrutierung von Koaktivatoren durch nukleäre Hormonrezeptoren

Nach der Aktivierung des nukleären Hormonrezeptors und der Bindung an spezifischen DNA-Erkennungssequenzen (HRE: hormone responsive element), erfolgt die schrittweise Rekrutierung unterschiedlicher Koaktivator-Komplexe. Diese sequentielle Rekrutierung führt zur ATP-abhängigen oder posttranslationalen Modifikation des Chromatins (z.B. Histon-Methylierungen (Me) und -Acetylierungen (Ac)) und schließlich zur Initiierung der Transkription. Die Dissoziation der Koaktivator-Komplexe erfolgt durch sekundäre Modifikationen und durch Abbau der beteiligten Proteine durch das 26S-Proteasom. Nach der Dissoziation der Koaktivatoren erfolgt die erneute sequentielle Assoziation der Koaktivator-Komplexe und der Beginn einer neuer Runde der Transkriptionsaktivierung. Nähere Erläuterungen: siehe Text.

1.3 LXXLL-Motive

LXXLL-Motive sind Protein-Erkennungssequenzen, die in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert wurden. Der Begriff LXXLL-Motiv leitet sich von der Aminosäure-Sequenz ab, in der L für die Aminosäure Leucin und X für eine beliebige andere Aminosäure steht. Die LXXLL-Sequenz wurde zuerst in Proteinen beschrieben, die ligandenabhängig an nukleäre Hormonrezeptoren binden (Heery et al., 1997 und Torchia et al., 1997). LXXLL-Motive spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation, der durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelten Transkription und werden daher auch oft, zusammen mit den benachbarten Aminosäuren, als NR (Nuclear Receptor)-Boxen bezeichnet. Es

zeigte sich jedoch, dass neben Koaktivator-Proteinen, wie den Mitgliedern der NCoA-Koaktivator-Familie (NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3) und p300/CBP, auch Korepressor-Proteine und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. STAT6 (Litterst and Pfitzner, 2002), LXXLL-Motive enthalten. Das LXXLL-Motiv bildet eine α -helikale Struktur. Mehrere Ansätze konnten bereits LXXLL-vermittelte Interaktionen in 3D-Strukturen darstellen. So konnte der Komplex der NCoA-1-LXXLL-Motive 1 und 2 mit der Liganden-Bindungsdomäne von PPAR γ (Nolte et al., 1998), das LXXLL-Motiv der STAT6-Transaktivierungsdomäne mit der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (Razeto et al., 2004) und das c-Myb-LXXLL-Motiv mit der KIX-Domäne von CBP (Zor et al., 2004) dreidimensional aufgelöst werden. Es zeigten sich dabei Unterschiede in der Bindungsart von LXXLL-Motiven an nukleären Hormonrezeptoren und nicht-nukleäre Hormonrezeptor-enthaltende Komplexe. Obwohl die LXXLL-Motive im Wesentlichen selbst für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich und ausreichend sind, spielen die flankierenden Aminosäuren eine sehr wichtige Rolle. Sie vermitteln die Spezifität und Affinität von LXXLL-vermittelten Interaktionen und stellen zusätzliche Kontakte mit dem Interaktionspartner her (McInerney et al., 1998; Darimont et al., 1998 und Plevin et al., 2005). In einigen Fällen sind dabei die flankierenden aminoterminalen Aminosäuren entscheidend (Mak et al., 1999; Needham et al., 2000; Northrop et al., 2000; Heery et al., 2001 und Coulthard et al., 2003), während bei anderen Interaktionen die carboxyterminalen Aminosäuren für die Spezifität wichtig sind (McInerney et al., 1998 und Northrop et al., 2000). Neben den unterschiedlichen Sequenzen der LXXLL-Motive und der flankierenden Bereiche, besitzen viele Koaktivatoren, wie z.B. die NCoA-Proteine oder CBP, multiple LXXLL-Motive, die auch kooperativ Interaktionen vermitteln können (Westin et al., 1998 und Nolte et al., 1998). Allerdings können mehrere LXXLL-Motive auch für verschiedene Interaktionen verantwortlich sein. So konnte gezeigt werden, dass die drei LXXLL-Motive in der NID von NCoA-1 unterschiedlich an der Interaktion mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren beteiligt sind. Dabei ist das zweite LXXLL-Motiv für die Interaktion mit dem Östrogen-Rezeptor (ER) notwendig und ausreichend, während der Thyreoidhormon-Rezeptor (TR) und der Retinsäure-Rezeptor (RAR) das zweite und das dritte Motiv benötigen. Im Gegensatz dazu interagieren der PPAR γ -Rezeptor und der Progesteron-Rezeptor (PR) über die

LXXLL-Motive 1 und 2 mit NCoA-1 (Torchia et al., 1997 und McInerney et al., 1998).

1.4 PAS-Domänen

PAS-Domänen wurden in Proteinen aus allen drei großen Organismengruppen (Eukaryoten, Bakterien und Archaeen) gefunden. Der Begriff PAS-Domäne leitet sich von den ersten Buchstaben der drei begründenden Mitglieder einer Proteinfamilie ab: PER (Period gene protein) aus *Drosophila melanogaster*, ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) aus Säugetieren und SIM (Single-minded gene product) aus *Drosophila melanogaster* (Nambu et al., 1991). PAS-Domänen umfassen zirka 250-300 Aminosäuren und enthalten zwei Subdomänen (PAS-A und PAS-B), die aus zwei degenerierten sich wiederholenden Sequenzabschnitten („repeats“) bestehen. Obwohl die Aminosäure-Sequenzen verschiedener PAS-Domänen sehr unterschiedlich sein können, sind die dreidimensionalen Strukturen ähnlich (Pellequer et al., 1998 und Vreede et al., 2003). Wie die NCoA-Proteine enthalten die meisten Proteine, in denen eine PAS-Domäne gefunden wurde, direkt N-terminal vor der PAS-Domäne eine bHLH-Domäne (Gu et al., 2000). PAS-Domänen konnten in vielen Signaltransduktionsmolekülen bzw. Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (zusammengefasst in Gu et al., 2000 und Kewley et al., 2004). Die PAS-Domänen fungieren dabei als sensorische Module (z.B. für Sauerstoff, Redox-Potential oder Licht), binden kleine Liganden und/oder Kofaktoren (z.B. Chromophore) (zusammengefasst in Taylor and Zhulin, 1999) oder sie vermitteln Protein-Protein-Interaktionen mit anderen PAS-Domänen, das heißt Homo- oder Heterodimerisierungen (Huang et al., 1993 und Lindebro et al., 1995) oder auch mit einem LXXLL-Motiv (Litterst and Pfitzner, 2002). Bei Mitgliedern der bHLH/PAS-Transkriptionsfaktor-Familie, wie z.B. AhR (Aryl hydrocarbon receptor) und ARNT erfolgt der Dimerisierungsprozess und die DNA-Bindung zwar über die bHLH-Domäne, allerdings fungiert die PAS-Domäne als eine weitere Dimerisierungsoberfläche. Die PAS-Domäne bestimmt dabei den Interaktionspartner, das heißt die Spezifität der Interaktion (Pongratz

et al., 1998) und stabilisiert die Interaktion der bHLH-Domänen (Reisz-Porszasz et al., 1994). Außerdem gibt es Hinweise, die darauf deuten, dass PAS-Domänen auch bei der Stabilisierung der DNA-Bindungs-Konformation der Dimere eine Rolle spielen (Numayama-Tsuruta et al., 1997 und Sun et al., 1997).

1.5 Zielsetzung

NCoA-Proteine haben wichtige Funktionen bei der Rekrutierung sekundärer Koaktivatoren für die durch STAT-Proteine und nukleäre Hormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung. Verschiedene Studien haben eine Assoziation von NCoA-Proteinen durch die bHLH/PAS-Domänen postuliert, jedoch konnte eine Dimerisierung über diese aminoterminalen Domänen nicht nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass NCoA-1 durch die PAS-B-Domäne mit einem LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 interagieren kann. Da NCoA-Proteine in ihrer Aminosäure-Sequenz LXXLL-Motive in verschiedenen Domänen enthalten, stellen sich im Zusammenhang mit der LXXLL-interagierenden PAS-B-Domäne von NCoA-1 verschiedene Fragestellungen die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen:

- 1.) Durch Koimmunopräzipitations-Experimente und GST-Interaktionsstudien soll untersucht werden, ob NCoA-Proteine miteinander interagieren und ob die PAS-B-Domäne die Interaktion zwischen NCoA-Proteinen vermitteln kann.
- 2.) NCoA-Proteine besitzen verschiedene funktionelle Domänen, die LXXLL-Motive enthalten und die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können. Es soll daher analysiert werden, welche Domänen bzw. LXXLL-Motive an einer Interaktion mit den PAS-B-Domänen beteiligt sind.

- 3.) Die Domänen der verschiedenen NCoA-Proteine zeigen eine unterschiedlich hohe Sequenzähnlichkeit. Daher soll untersucht werden, ob es Unterschiede bei der Interaktions-Spezifität und den beteiligten Bindungsregionen zwischen den NCoA-Proteinen gibt.

- 4.) Eine wichtige Funktion der NCoA-Proteine stellt die Rekrutierung sekundärer Koaktivatoren dar. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die physiologische Bedeutung einer Interaktion zwischen NCoA-Proteinen untersucht werden. Dabei soll überprüft werden, ob die Interaktion zwischen NCoA-Proteinen Einfluss auf die Interaktionen mit anderen Koaktivatoren oder die Rekrutierung von NCoA-Proteinen durch Transkriptionsfaktoren haben kann.

- 5.) Bei der Regulation der Transkription ist die Rekrutierung von Koaktivatoren ein essentieller Schritt. Die Bildung und der Aufbau von Koaktivator-Komplexen wirkt sich dabei auf die Expression von Zielgenen aus. Aus diesem Grund soll die Bedeutung der Interaktion von NCoA-Proteinen auf die Expression von Zielgenen nukleärer Hormonrezeptoren untersucht werden. Hierbei soll analysiert werden, ob die Überexpression der beteiligten Domänen zu einer Konkurrenz führen kann und damit zu einer veränderten Expression der Zielgene.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterial

96-Loch-Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Mikrotiterplatten (weiß)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gel-Blotting-Papiere	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme (Fuji Medical X-Ray Film)	Fuji Film, Düsseldorf
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm und 15 cm)	Greiner bio-one, Frickenhausen
6, 12, 24-Loch-Zellkulturschalen	Corning, New York (USA)
Sterilfilter Stericup (0,22 µm), 500 ml	Millipore, Eschborn

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma
ε-Aminocaprinsäure	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
(MgCO ₃) ₄ x Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
17β-Östradiol (E2)	Sigma, Taufkirchen
³⁵ S-Methionin	Amersham Biosciences, Freiburg
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1))	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Amplify	Amersham Biosciences, Freiburg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, Taufkirchen
ATP (Adenosin 5'-Triphosphat) Dinatrium-Salz	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Bovine Serum Albumin)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Chloramphenicol	Merck, Darmstadt
Coenzym A Hydrat	Sigma, Taufkirchen

Chemikalien	Firma
Coomassie Brilliant Blau (Serva Blue G)	Serva, Heidelberg
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Applichem, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
dNTP-Mix, je 10 mM	Peqlab, Erlangen
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
ECL Plus Chemilumineszenzsystem	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	Applichem, Darmstadt
Emerald Lumineszenz-Verstärker	Tropix, Bedford (USA)
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Galacton	Tropix, Bedford (USA)
GITC (Guanidinisothiocyanat)	Roth, Karlsruhe
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Applichem, Darmstadt
Glycylglycin	Applichem, Darmstadt
Glyzerin	Applichem, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid-Dihydrat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kanamycin	Applichem, Darmstadt
Luziferin, freie Säure	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ 6xH ₂ O (Magnesiumchlorid-Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka, Buchs (Schweiz)
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Fluka, Buchs (Schweiz)
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Roth, Karlsruhe
NP-40 (Nonidet P-40-Substitute)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitor Mix „Complete“, EDTA-frei	Roche, Mannheim
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Applichem, Darmstadt
TEMED	Applichem, Darmstadt
Tricin/NaOH pH 7,8	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen und Puffer wurden autoklaviert (20 min bei 121° C und 2 bar) oder sterilfiltriert.

Lösung/Puffer	Bestandteile
10x TBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
10x TAE	400 mM Tris/Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
TBST	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20
SDS-Laufpuffer	250 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,0
Anodenpuffer 1	300 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 10% (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau
Coomassie-Entfärbelösung	40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Die Zusammensetzung der weiteren verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.1.4 Kits und Größenstandard-Marker

	Firma
4x Proteinauftragspuffer Roti-Load 1, reduzierend	Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard, 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Eggenstein
Proteingrößenstandard Precision Plus Protein Standards Dual Color	Biorad, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) verwendet.

Enzym	Firma
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main
Vent _R [®] DNA Polymerase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main
TEV-Protease	Stefan Becker, Max-Planck-Institut, Göttingen

2.1.6 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden bei Western-Blot-Analysen (WB) und /oder Immunopräzipitations-Versuchen (IP) eingesetzt.

2.1.6.1 Primärantikörper

Name/Antigen	Hersteller/Referenz	monoklonal/polyklonal	Spezies	Verdünnung/ Menge
SRC-1 (M341)	Santa Cruz, Heidelberg	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000 IP: 4 µg
SRC-1 1135	Biomol, Hamburg	monoklonal	Maus	WB: 1:1000
NCoA-3 (M397)	Santa Cruz, Heidelberg	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000 IP: 4 µg
Living Colors Full-length (GFP, CFP, YFP)	Clontech, Heidelberg	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000 IP: 1:250
Myc-Tag 9B11	Cell Signaling, Beverly, USA	monoklonal	Maus	WB: 1:1000
Anti-Aktin	Sigma, Taufkirchen	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma, Taufkirchen	monoklonal	Maus	IP: 25 µl
IgG	Santa Cruz, Heidelberg	-	Kaninchen	IP: 4 µg

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Sekundäre Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper, die gegen Maus IgG und Kaninchen IgG gerichtet sind, wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen und mit einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt.

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (München) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Name	Verwendung	Sequenz (5'→3')	Referenz
forNCoA1_1_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 1 von hNCoA-1	CGGGATCCATGAGTGGCCTCGGGGAC	Diese Arbeit
forNCoA1_1_Stul	5' Primer mit Stul ab AS 1 von hNCoA-1	GAAGGCCTATGAGTGGCCTCGGGGAC	Diese Arbeit
pClau73Bam_f	5' Primer mit BamHI ab AS 260 von hNCoA-1	CGGGATCCGGGAATCCTTTATGACCAAG	Diese Arbeit
Clau60	5' Primer mit BamHI ab AS 257 von mNCoA-1	TGGATCCTAACAGGTGTAGAATC	Claudia Litterst, Doktorarbeit
forhNCoA1_260_Stul	5' Primer mit Stul ab AS 260 von hNCoA-1	GAAGGCCTGAATCCTTTATGACCAAG	Diese Arbeit
forhNCoA1_260_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 260 von hNCoA-1	CGGGATCCGAATCCTTTATG	Diese Arbeit
revNCoA1_370_BamHI	3' Primer mit BamHI ab AS 370 von hNCoA-1	CGGGATCCTTACCCACTGTGCTCCCT	Diese Arbeit
revNCoA1_370_XbaI	3' Primer mit XbaI ab AS 370 von hNCoA-1	GCTCTAGATTACCCACTGTGCTCCCT	Diese Arbeit
Clau74A	3' Primer mit XhoI ab AS 370 von hNCoA-1	CCGCTCGAGTTACCCACTGTGCTC	Claudia Litterst
Clau43A	3' Primer mit XhoI ab AS 462 von mNCoA-1	CGCTCGAGGAACCTGCCTGTT	Claudia Litterst, Doktorarbeit
forNCoA1_901_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 901 von hNCoA-1	CGGGATCCCAGAGTAAATCAGAAGAC	Diese Arbeit
forNCoA1_901_EcoRI	5' Primer mit EcoRI ab AS 901 von hNCoA-1	CGGAATTCACAGAGTAAATCAGAAGAC	Diese Arbeit
forNCoA1_901_NdeI	5' Primer mit NdeI ab AS 901 von hNCoA-1	GGAATTCATATGCAGAGTAAATCAGAAGAC	Diese Arbeit
revhNCoA1_937_EcoRI	3' Primer mit EcoRI ab AS 937 von hNCoA-1	CGGAATTCTTATACCAGCTGTTTC	Diese Arbeit

Name	Verwendung	Sequenz (5'→3')	Referenz
forNCoA1_938_EcoRI	5' Primer mit EcoRI ab AS 938 von hNCoA-1	CGGAATTCATCCTTCCTTAGT	Diese Arbeit
revNCoA1_970_BamHI	3' Primer mit BamHI ab AS 970 von hNCoA-1	CGGGATCCTTATGATAATACATCTAA	Diese Arbeit
revNCoA1_970_EcoRI	3' Primer mit EcoRI ab AS 970 von hNCoA-1	CGGAATTCCTTATGATAATACATCTAA	Diese Arbeit
revNCoA1_970_XhoI	3' Primer mit XhoI ab AS 970 von hNCoA-1	CCGCTCGAGTTATGATAATACATCTAA	Diese Arbeit
pClau75Eco_f	5' Primer mit EcoRI ab AS 268 von NCoA-2	CGGAATTCGAAAGTTTTACTAC	Diese Arbeit
Clau76A	3' Primer mit XhoI ab AS 379 von hNCoA-2	CCGCTCGAGTTACACATTCTGCTC	Claudia Litterst
forhNCoA3_265_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 265 von hNCoA-3	CGGGATCCGAGAGCTTTATT	Diese Arbeit
pClau77Eco_f	5' Primer mit EcoRI ab AS 265 von hNCoA-3	CGGAATTCGAGAGCTTTATTACC	Diese Arbeit
forhNCoA3_265_EcoRI	5' Primer mit EcoRI ab AS 265 von hNCoA-3	CGGAATTCAGAGAGCTTTATTACC	Diese Arbeit
revhNCoA3_375_SpeI	3' Primer mit SpeI ab AS 375 von hNCoA-3	GGACTAGTTTTATCCATTCTGTTC	Diese Arbeit
Clau78A	3' Primer mit XhoI ab AS 375 von hNCoA-3	CCGCTCGAGTTATCCATTCTGTTC	Claudia Litterst
forhNCoA3_1022_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 1022 von hNCoA-3	CGGGATCCCATGGCACTCAA	Diese Arbeit
forhNCoA3_1022_XhoI	5' Primer mit XhoI ab AS 1022 von hNCoA-3	CCGCTCGAGCATGGCACTCAA	Diese Arbeit
revhNCoA3_1092_BamHI	3' Primer mit BamHI ab AS 1092 von hNCoA-3	CGGGATCCTTACTGTTTGGGCTC	Diese Arbeit
revhNCoA3_1092_XbaI+B	3' Primer mit XbaI und BamHI ab AS 1092 von hNCoA-3	GCTCTAGAGGATCCTTACTGTTTGGGCTC	Diese Arbeit
fmCBP2058_BamHI	5' Primer mit BamHI ab AS 2058 von mCBP	CGGGATCCCAGCCACCAAGG	Diese Arbeit
fmCBP2058EcoRI	5' Primer mit EcoRI ab AS 2058 von mCBP	CGGAATTCACAGCCACCAAGG	Diese Arbeit
rmCBP2130_EcoRI	3' Primer mit EcoRI ab AS 2130 von mCBP	CGGAATTCCTAGGGCTGCATACC	Diese Arbeit
revmCBP_2130_XhoI	3' Primer mit XhoI ab AS 2130 von mCBP	CCGCTCGAGTTAGGGCTGCATACC	Diese Arbeit

2.1.7.2 Oligonukleotide für quantitative RT-PCR

Name	RNA	Sequenz (5'→3')	Referenz
18S for	18S RNA	CGGCTACCACATCCAAGGA	Baus and Pfitzner, 2006
18S rev		CCAATTACAGGGCCTCGAAA	
for-PSA-QPCR	humanes PSA (Prostate specific antigen)	GGCAGCATTGAACCAGAGGAG	Wang et al., 2005
rev-PSA-QPCR		GCATGAACTTGGTCACCTTCTG	
f-NCOA1PAS-RT	hNCoA-1 PAS-B-Domäne (AS 260-370)	TCAGGGCAGAGAACCATCTTAT	Diese Arbeit
r-NCOA1PAS-RT		CATGATGAAAGGTTGCATGTCT	
f-NCOA3PAS-RT	hNCoA-3 PAS-B-Domäne (AS 265-375)	ATGGTCCCAGAAACGTCACTAT	Diese Arbeit
r-NCOA3PAS-RT		AAGGAAGTGGGTTGAGACAAAG	

2.1.7.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Vektor	Sequenz (5'→3')
pGEX 5'	pGEX-Vektoren	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
SP6	Vektoren mit SP6-Promotor	GATTTAGGTGACACTATAGAATAC
pMX-1	pMX-Vektoren	TCGCAGCTTGGATACACG
SFFV-for	pVIG-IRES-Vektoren	GCTTCTGCTTCCCGAGCTC

2.1.8 Peptide

Die aufgeführten Peptide wurden von Stefan Becker, (Max-Planck-Institut, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Peptidname	Aminosäure-Sequenz	Molekulargewicht [Da]
hNCoA-1 LXXLL-Motiv 1 (EP4)	KYSQTSHKLVQLLTTTAEQQL	2417,7
hNCoA-1 LXXLL-Motiv 2 (EP5)	SLTERHKILHRLLQEGSPSDI	2429,8
hNCoA-1 LXXLL-Motiv 3 (EP6)	KESKDHQLLRYLLDKDEKDLR	2642,9
hNCoA-1 LXXLL-Motiv 4 (EP2)	EDQCISSQLDELLCPPTTVEG	2277,5
hNCoA-1 LXXLL-Motiv 5 (EP3)	EGRNDEKALLEQLVSFLSGKD	2350,6
hSTAT6 LXXLL-Motiv (F3)	LLPTEQDLTKLLLEGQGESG	2238,5

2.1.9 Vektoren

2.1.9.1 Bakterielle Expressionsvektoren für GST- oder Poly-His-Fusionsproteine

Zur Klonierung und/oder späteren Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die Plasmide pGEX-5x-1 (Amersham Pharmacia, Freiburg) und pGEX-2-TEV (Stefan Becker, Max-Planck-Institut, Göttingen) verwendet. Die Derivate des Vektors pGEX-2-TEV enthalten hinter dem GST und vor der multiplen Klonierungsstelle eine Erkennungssequenz in der Aminosäure-Sequenz für die TEV-Protease.

Für die Expression von Poly-His-Fusionsproteinen wurde ein Derivat des pET16b-Vektorsystems (Novagen, Darmstadt) verwendet, das ebenso in der Aminosäure-Sequenz eine TEV-Protease-Erkennungssequenz enthält.

Bezeichnung	Kodiertes Insert	Derivat von pGEX- oder pET-Plasmid	Referenz
GST-hNCoA-1 PAS B	GST-hNCoA-1 AS 260-370	pGEX-5x-1	Diese Arbeit
GST-hNCoA-2 PAS B	GST-hNCoA-2 AS 268-379	pGEX-5x-1	Diese Arbeit
GST-hNCoA-3 PAS B	GST-hNCoA-3 AS 265-375	pGEX-5x-1	Diese Arbeit
pGEX2TEV-hNCoA-1 1-370	GST-hNCoA-1 AS 1-370	pGEX-2-TEV	Diese Arbeit
pGEX2TEV-hNCoA-1 901-970	GST-hNCoA-1 AS 901-970	pGEX-2-TEV	Diese Arbeit
pGEX2TEV-hNCoA-3 1022-1092	GST-hNCoA-3 AS 1022-1092	pGEX-2-TEV	Diese Arbeit
GST-mNCoA-1 257-462	GST-mNCoA-1 AS 257-462	pGEX-5x-1	Diese Arbeit
pGEX-AHK	GST	pGEX-AHK	Thorsten Heinzel, (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/M.)
pGEX2TEV-mCBP 2058-2130	GST-mCBP AS 2058-2130	pGEX-2-TEV	Diese Arbeit

Bezeichnung	Kodiertes Insert	Derivat von pGEX- oder pET-Plasmid	Referenz
pET-hNCoA-1 901-970	7xHis-hNCoA-1 AS 901-970	pET16bTEV	Diese Arbeit
pET16bTEV-hNCoA3(aa262-373)	7xHis-hNCoA-3 AS 262-373	pET16bTEV	Stefan Becker (Max-Planck-Institut, Göttingen)

2.1.9.2 Vektoren für die Expression in Säugerzellen oder zur *in vitro*-Transkription/Translation über SP6- oder T7-Promotoren

Zur Expression von Fusionskonstrukten (E) oder zur *in vitro*-Transkription/Translation (IVT) wurden Plasmide verwendet mit einem N-terminalen Penta- oder Hexa-Myc-Anhang (pCS2+ und pMT, abgeleitet vom Plasmid pCS2+MT mit einem sCMV-IE94-Promotor) und Plasmide, die einen CMV-Promotor (pCMV oder pcDNA3.1) oder einen SV40-Promotor (pSG5) enthalten. Vektoren, die für die *in vitro*-Transkription/Translation eingesetzt wurden, enthalten außerdem noch einen SP6- oder T7-Promotor. Das in dieser Tabelle aufgeführte pCla-Konstrukt ist abgeleitet vom Plasmid pCS2+MT und enthält einen N-terminalen Hexa-Myc-Anhang.

Bezeichnung	Kodiertes Insert	Verwendung	Referenz
pCS2+SRC-1(569-805)	Ratten SRC-1 AS 569-805	IVT(SP6)	Ludger Klein-Hitpass (Universitätsklinikum Essen)
pCS2+SRC-1(804-1032)	Ratten SRC-1 AS 804-1032	E, IVT(SP6)	
pCS2+SRC-1(1258-1442)	Ratten SRC-1 AS 1258-1442	IVT(SP6)	
pMT-hNCoA-1 901-970	Humanes NCoA-1 AS 901-970	IVT(SP6)	Diese Arbeit
pMT-hNCoA-1 901-937	Humanes NCoA-1 AS 901-937	IVT(SP6)	Diese Arbeit
pMT-hNCoA-1 938-970	Humanes NCoA-1 AS 938-970	IVT(SP6)	Diese Arbeit
pMT-hNCoA-3 1022-1092	Humanes NCoA-3 AS 1022-1092	IVT(SP6)	Diese Arbeit

Bezeichnung	Kodiertes Insert	Verwendung	Referenz
pCMX-SRC.1(HA)	Maus NCoA-1	E, IVT(T7)	Joe Torchia (University of West Ontario, London, Canada)
pCMX-NCoA-2	Maus NCoA-2	IVT(T7)	
pCMX-NCoA-3 (p/CIP)	Maus NCoA-3	IVT(T7)	
pSG5-hSRC-1e	Humanes NCoA-1	IVT(T7)	Malcolm Parker (Molecular Endocrinology Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, London, UK)
pSG5-TIF2	Humanes NCoA-2	IVT(T7)	Voegel et al., 1996
pcDNA3.1-AIB1	Humanes NCoA-3	IVT(T7)	Anzick et al., 1997
pMT-hNCoA-1 1- 370	Humanes NCoA-1 AS 1-370	IVT(SP6)	Diese Arbeit
pCla36.2	Humanes STAT6 AS 792-847	IVT(SP6)	Claudia Litterst, Doktorarbeit
pMT-hNCoA-1 260-370	Humanes NCoA-1 AS 260-370	E	Diese Arbeit
pMT-hNCoA-3 265-375	Humanes NCoA-3 AS 265-375	E	Diese Arbeit
pRSV-hER	Humaner Östrogen- Rezeptor	E	Ali et al., 1993

2.1.9.3 Expressionsvektoren für Säugerzellen (Reporterplasmide, generelle Expressionsplasmide)

Bezeichnung	Reportergen (Promotor- Element)	Referenz
pCH110	<i>lacZ</i> -Gen (SV40-Promotor)	Wakao et al., 1994
pGL2-ERE TK- luc	Östrogen-Rezeptorbindestelle (ERE) vor einem Luziferase- Reportergen (TK-Promotor)	Ludger Klein-Hitpass (Universitätsklinikum Essen)

2.1.9.4 Expressionsvektoren für Fusionsproteine mit YFP oder FLAG-tag

Die folgenden Plasmide leiten sich entweder für CFP- bzw. YFP-Fusionsproteine von pECFP-C1 bzw. pEYFP-C1 (Clontech, BD Bioscience, Heidelberg) oder für FLAG-markierte Proteine von pMX-FLAG-IRES-GFP (Frauke Döll, Doktorarbeit) ab.

Bezeichnung	Kodiertes Insert	Referenz
EYFP-SRC-1 213-462	Ratten NCoA-1 AS 213-462	Phillip Schild, Diplomarbeit
pMX-FLAG-mCBP 2058-2130	FLAG-mCBP AS 2058-2130	Diese Arbeit

2.1.9.5 Retrovirale Expressionsvektoren

Bezeichnung	Reportergen (Promotor-Element)	Referenz
pVIG-FLAG	Lentiviraler Expressionsvektor	K. Brocke-Heidrich (Universitätsklinikum Leipzig)
pVIG-FLAG-hNCoA-1 AS 260-370	Lentiviraler Expressionsvektor für humanes NCoA-1 AS 260-370	Diese Arbeit
pVIG-FLAG-hNCoA-3 AS 265-375	Lentiviraler Expressionsvektor für humanes NCoA-3 AS 265-375	Diese Arbeit
pHIT-G	Verpackungsplasmid für pVIG-Vektoren	Fouchier et al., 1997
delta sp2	Verpackungsplasmid für pVIG-Vektoren	Schnell et al., 2000

2.1.10 Bakterien und Bakterienmedien

Für molekularbiologische Arbeiten, wie Klonierungen und DNA-Präparationen, wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α eingesetzt. Zur Gewinnung von Proteinen wurden die *Escherichia coli*-Stämme BL 21 (DE3) pLysS oder BL21 (DE3) Codon Plus RIL verwendet. Diese Stämme wurden zusätzlich unter Chloramphenicol-Selektion gehalten.

<i>E. coli</i>-Stamm	Genotyp
DH5 α	<i>endA1 hsdR17 (rk⁻ mk⁻) supE44 thi⁻ λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 80dlaclqZD M15</i>
BL 21 (DE3) pLysS	<i>E. coli B F dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal I (DE3) [pLysS Cam^r]</i>
BL21 (DE3) Codon Plus RIL	<i>E. coli B F ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^f gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cm^R]</i>

Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Das Medium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Antibiotika wurden den Medien und Platten in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Antibiotikum	Konzentration [μg/ml]
Ampicillin	100
Chloramphenicol	34
Kanamycin	25

2.1.11 Zellkulturlösungen

Lösung	Firma
DMEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium), 4,5 g/l D-Glukose	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
DMEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium), 4,5 g/l D-Glukose, phenolrotfrei	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute Medium), 4,5 g/l D-Glukose	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute Medium), 4,5 g/l D-Glukose, phenolrotfrei	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
L-Glutamin	PAA, Pasching (Österreich)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching (Österreich)
Isoton II	Becton Dickinson, Heidelberg
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching (Österreich)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Eggenstein
Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Eggenstein

Alle eingesetzten Zellkulturmedien enthielten 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. FCS wurde zur Komplement-Inaktivierung vor dem Gebrauch für 30 min bei 56° C erhitzt.

2.1.12 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	ATCC/DSMZ- Nummer/ Referenz/Quelle	Medium
293T	Humane fötale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA	CRL-1573 (ATCC)	DMEM
HeLa TA	Humane Adenomakarzinom-Zellen, Zervix mit Tet-transaktivator	CCL-2 (ATCC)	DMEM
LnCap	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie	ACC 256 (DSMZ)	RPMI 1640

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation chemokompetenter Bakterien

Die Präparation chemokompetenter Bakterien (Stämme *E.coli* DH5 α , BL 21 (DE3) pLysS und BL21 (DE3) RIL) erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983).

Lösungen:

- LB (Luria-Bertani)-Medium:

10 g/l Kasein, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt in Wasser, autoklaviert

- Lösung TFB I:

100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 13% (v/v) Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert, Lagerung bei 4° C

- Lösung TFB II:

10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13% (v/v) Glycerin, pH 7,0, sterilfiltriert, Lagerung bei 4° C

Zur Präparation chemokompetenter Bakterien wurden 150 ml einer Bakterienkultur in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 (optimal 0,375) inkubiert und anschließend sedimentiert (2.000 x g, 10 min, 4° C). Das Bakteriensediment wurde danach in 50 ml TFB I-Lösung resuspendiert und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation (2.000 x g, 10 min, 4° C) und die Lösung des Sedimentes in 4 ml TFB II-Lösung. Nach einer Inkubation für 10 bis 20 Minuten auf Eis wurde die Bakteriensuspension aliquotiert (100 μ l) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemokompetenten Bakterien erfolgte bei -80° C.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Lösungen:

- LB (Luria-Bertani)-Medium:

10 g/l Kasein, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt in Wasser, autoklaviert

Zur Transformation wurden chemokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde zu 25-100 µl Bakteriensuspension gegeben, gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien für 2 Minuten im Wasserbad bei 42° C, der zur Aufnahme der DNA durch die Bakterien führt. Nach einer Inkubation von 2 Minuten auf Eis, erfolgte die Zugabe von 400 µl LB-Medium und die Inkubation für 30-60 Minuten bei 37° C auf dem Schüttler. Danach wurden die transformierten Bakterien auf LB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.1.3 Analytische Plasmidisolierung aus Bakterien (Mini-Präparation)

Die analytische Plasmidisolierung wurde mit Hilfe der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983) und einer nachfolgenden Butanol-Fällung der isolierten DNA durchgeführt.

Dazu wurden 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (19.000 x g, 1 min). Nach erfolgter Lyse der Bakterien, wurde das geklärte Bakterienlysat mit 1,5-fachem Volumen 6 M Guanidinisothiocyanat (GITC) und 2-fachem Volumen Butanol versetzt. Die Sedimentierung der gefällten DNA erfolgte durch Zentrifugation (19.000 x g, 10 min). Nach einem Waschschriff mit 70% Ethanol (19.000 x g, 10 min) wurde die DNA getrocknet und anschließend in 25 µl H₂O resuspendiert.

2.2.1.4 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien (Maxi-Präparation)

Zur präparativen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der „QIAquick Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen, Hilden eingesetzt. Die Kultivierung der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach

Herstellerangaben. Die gewonnene DNA wurde in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine OD₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Der Gesamtgehalt der DNA ergibt sich dadurch folgendermaßen:

Bestimmter OD₂₆₀-Wert x Verdünnungsfaktor x 50 = µg DNA/ml

2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den dazugehörigen Puffern nach Herstellerangaben. Dabei wurden, neben den zu verwendenden Puffern, die einzusetzende Enzymmenge, die optimale Reaktionstemperatur und die Inkubationszeit berücksichtigt.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA wurde die T4-DNA-Ligase und der dazugehörige Ligasepuffer der Firma New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main verwendet. Die DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer, im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden, freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Eine Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 15 µl nach Angaben des Herstellers über Nacht bei 16° C im Wasserbad.

2.2.1.8 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung des endständigen 5'-Phosphatrestes linearisierter Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase verhindert die Selbstligation. Nach einem Restriktionsverdau erfolgte die Zugabe von 0,5 Units alkalischer Phosphatase (CIP (Calf Intestine Phosphatase), New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main) zu 1 µg eingesetzter DNA. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37° C.

2.2.1.9 Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Fragmenten mittels Klenow

Das Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des großen Fragmentes der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus *E. coli*. Das Enzym ist eine DNA-abhängige 5'-3'-Polymerase und besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Es wurde eingesetzt, um die Ligation in Vektoren ohne überhängende Enden (stumpfe Enden) zu ermöglichen. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main) durchgeführt.

2.2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

- 10x TBE:

890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0

- 10x TAE:

400 mM Tris/Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

- 10x DNA-Probenpuffer:

25% (w/v) Ficoll, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der Größe von DNA-Fragmenten eingesetzt. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8% bis 1,5% (w/v) Agarosegele mit 1x TBE- oder 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden den Agarosegelen vor dem Gießen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen einzelnen Basenpaaren eines doppelsträngigen DNA-Moleküls und ermöglicht

somit die Visualisierung der DNA durch die Fluoreszenz des Farbstoffes unter UV-Licht. Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 70-100 Volt. Als Größenstandard wurde der 1 Kb Plus DNA-Größenstandard von Invitrogen, Eggenstein benutzt.

2.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach der Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde der Gelextraktionskit „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen, Hilden verwendet.

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR (Polymerase chain reaction)) wurde zur selektiven und spezifischen Amplifikation von DNA-Bereichen eingesetzt. Dazu wurden spezifische Oligonukleotid-Primerpaare und eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*) verwendet. Eine standardmäßig durchgeführte PCR wurde folgendermaßen angesetzt: zu 100 ng der Matrizen-DNA wurden jeweils je 10 pmol der beiden Oligonukleotidprimer, 5 µl des entsprechenden 10x DNA-Polymerase-Puffers und 1 µl eines dNTP-Gemisches (jeweils 10 µM jedes Nukleotides) gegeben. Das Gesamtvolumen einer PCR-Reaktion betrug 50 µl. Die Reaktion erfolgte in einer T-Gradient-PCR-Maschine der Firma Whatman Biometra, Göttingen. Nach einer Inkubation von 4 Minuten bei 95° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 Units Vent_R[®] DNA Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) gestartet. Zur spezifischen Amplifikation des DNA-Abschnittes erfolgten anschließend 25-30 Zyklen mit folgendem Programm:

1.	Denaturierung	95° C	30 sec
2.	Hybridisierung	50-60° C (abhängig vom Primerpaar)	30 sec
3.	Synthese	72° C	1 min/1 kb Amplifikat

Zur Beendigung der Synthese unvollständiger Produkte erfolgte abschließend die Inkubation der PCR-Ansätze bei 72° C für 8 Minuten.

2.2.1.13 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Lösungen:

- **0,2% DEPC-Wasser:**

0,2% (v/v) DEPC in H₂O

Die Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels peqGOLD TriFast™ der Firma Peqlab, Erlangen und des „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden nach den Angaben der Hersteller. Die Elution der RNA erfolgte mit DEPC-Wasser.

2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht ein OD₂₆₀-Wert von 1 gleich 33 µg/ml einzelsträngiger RNA.

2.2.1.15 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Die reverse Transkription von RNA erfolgte mit dem „Omniscript Reverse Transcription Kit“ der Firma Qiagen, Hilden. Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurden 4 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurden 400 ng Hexamer-Primer, 8 Units Omniscript Reverse Transkriptase, 20 Units RNase-Inhibitor (RnaseOut, Invitrogen, Karlsruhe), dNTP-Mix (Endkonzentration 0,5 mM) in 1x RT-Puffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl zusammengegeben. Die Umschreibung erfolgte für 1 Stunde bei 37° C und anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 3 Minuten bei 93° C hitzeinaktiviert.

2.2.1.16 Quantitative RT-PCR mit dem i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System

Für die quantitative RT-PCR im i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR-Detektionssystem (Biorad, München) wurden 3 µl eines RT-PCR-Ansatzes in einer Reaktion mit spezifischen Primern eingesetzt. Für eine PCR-Reaktion erfolgte die Zugabe von jeweils 0,5 µl der spezifischen Oligonukleotide (10 pmol/µl) und 12,5 µl des „Absolute QPCR SYBR Green Mix“ (Abgene, Epsom, UK) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Zur Kompensation von messbedingten Schwankungen erfolgten alle Ansätze in Triplikaten.

2.2.1.17 Auswertung der quantitativen RT-PCR-Daten

Die mit Hilfe des i-Cyclers gemessenen Daten wurden mit der ΔC_T -Methode (Biorad, München) ausgewertet. Der erhaltene C_T -Wert des zu untersuchenden Gens („GOI“ = gene of interest) wird dabei mit dem C_T -Wert eines nicht-regulierten Gens („HKG“ = house keeping gene; bei diesen Messungen 18S-RNA) mit der folgenden Formel berechnet, um den relativen Expressionslevel zu bestimmen:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(S\Delta C_T - C\Delta C_T)}$$

ΔC_T : Differenz der C_T -Werte von reguliertem Gen (GOI) zu nicht-reguliertem Gen (HKG). (GOI C_T – HKG C_T)

$S\Delta C_T - C\Delta C_T$: Differenz zwischen den regulierten Ansätzen ΔC_T ($S\Delta C_T$) und der Kontrolle ΔC_T ($C\Delta C_T$)

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO₂-Gehalt von 5% (v/v) kultiviert.

Für die Stimulation von Zellen mit Steroidhormonen erfolgte die Inkubation für mindestens drei Tage in phenolrotfreiem Medium mit hormonfreiem FCS. Anschließend erfolgte die Zugabe von frischem Medium und die Behandlung der Zellen mit 17β-Östradiol (E2; 10⁻⁷ M) oder Dihydrotestosteron (DHT; 10⁻⁷ M). Als Kontrollansätze wurden Zellen in der entsprechenden Verdünnung mit 100% Ethanol behandelt, da Ethanol als Lösungsmittel für die Steroidhormone diente. Die Zellen wurden nach Beginn der Stimulation für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Herstellung von hormonfreiem FCS

Lösungen:

- Aktivkohle-Dextran-Gemisch:

10 g Aktivkohle und 10 g Dextran in 100 ml H₂O

Zur Herstellung hormonfreien Fötalen Kälberserums (FCS) wurden zunächst 50 g Ionenaustauscherharz AG 1-X8 Resin (Biorad, München) in 50 ml H₂O dest. für 1 Stunde bei 4° C unter Rühren inkubiert. Nach dem Absetzen wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift wiederholt. Anschließend erfolgte die Inkubation von 25 g des Ionenaustauscherharzes mit 500 ml FCS für 5 Stunden bei 4° C unter Rühren. Das Serum wurde nachfolgend in eine neue Flasche überführt und mit weiteren 25 g Ionenaustauscherharz und 10 ml Aktivkohle-Dextran-Gemisch über Nacht unter Rühren inkubiert. Danach erfolgte das Abdekantieren des Überstandes und die erneute Zugabe von 10 ml Aktivkohle-Dextran-Gemisch zu dem Serum. Anschließend wurde das FCS für 1 Stunde unter Schütteln bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Das hormonfreie FCS wurde danach zweimal mit Hilfe von Filterpapier filtriert, anschließend sterilfiltriert und nach der Aliquotierung bei -20° C gelagert.

2.2.2.3 Passagieren von eukaryotischen Zellen

Zum Passagieren adhärenter Zellen wurden diese zunächst 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5-10 Minuten bei 37° C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in dem entsprechenden Medium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl auf neue Schalen ausgesät.

2.2.2.4 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen erfolgte zunächst das Ablösen adhärenter Zellen, die Resuspension in 10 ml Medium und die Sedimentation (1.500 x g, 5 min). Das Zellsediment wurde danach in Einfriermedium (90% (v/v) Fötales Kälberserum (FCS), 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -20° C für 24 Stunden gelagert. Anschließend erfolgte die Überführung zu -80° C für 1-2 Tage. Die dauerhafte Lagerung erfolgte schließlich in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst bei 37° C in einem Wasserbad kurz inkubiert und anschließend in 10 ml Medium aufgenommen. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen sedimentiert (1.500 x g, 5 min), erneut in Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturschale überführt.

2.2.2.5 Zellzahlbestimmung mittels Coulter Counter

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden Zellen in Suspension 1:20 oder 1:50 mit Isoton II verdünnt. Durch den Coulter Counter der Firma Beckman Coulter (Krefeld) wurde die Anzahl der Partikel bestimmt. Die Ausschlussgröße von lebenden Zellen beträgt dabei 5-18 µm.

2.2.2.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

2.2.2.6.1 Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Lösungen:

- Lösung A:

0,5 M CaCl₂, 0,1 M HEPES, pH 6,95 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert

- Lösung B:

50 mM HEPES, 0,75 mM NaH₂PO₄, 0,75 mM Na₂HPO₄, 0,28 M NaCl, pH 6,95 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert

293T-Zellen wurden mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode transfiziert (Graham and van der Eb, 1973). Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Zellzahl von $1-2 \times 10^6$ Zellen auf einer 10 cm-Petrischale ausgesät. Zwei Stunden vor Beginn der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für jeden Transfektionsansatz wurden 3-10 µg DNA eingesetzt. Zunächst wurde das Volumen der DNA-Lösung mit H₂O auf 240 µl ergänzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 240 µl Lösung A und die Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Minuten. Die Zugabe von 480 µl Lösung B erfolgte tröpfchenweise bei gleichzeitigem Vortexen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Präzipitate vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Kristalle wurden nach 16 Stunden Inkubation durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für weitere 24-48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.6.2 Transfektion mittels Superfect-Reagenz

HeLa TA-Zellen wurden mit dem „Superfect“-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers transfiziert.

2.2.2.7 Virale Transduktion eukaryotischer Zellen

2.2.2.7.1 Transiente Transfektion von Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln

Zur Herstellung von Zelllinien, die verschiedene Fusionsproteine stabil exprimieren, wurden Lentiviren zur Transduktion verwendet. Die Produktion der Viruspartikel erfolgte durch Kotransfektion mit Plasmiden, die die Polymerase des MLV (Murine Leukemia Virus) konstitutiv exprimieren, einem Plasmid, das das G-Glyko-Hüllprotein des vesikulären Stomatitis-Virus enthält und das Plasmid, das das gewünschte Fusionsprotein kodiert.

Für die Transfektion wurden 293T-Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen auf einer 10 cm-Petrischale ausgesät. Drei Stunden vor Beginn der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für jeden Transfektionsansatz wurden insgesamt 21 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Dabei besteht ein Transfektionsansatz aus 11 µg der lentiviralen Vektoren der Verpackungsplasmide delta sp2 (7 µg) und pHit-G (4 µg) und 10 µg des gewünschten Plasmides (pVIG) mit dem entsprechenden Fusionskonstrukt. Die Transfektion erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.6.1 nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode. Die Kristalle wurden nach 16 Stunden Inkubation durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen nach Zugabe von je 6 ml Medium für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Kulturüberstand, der die Viruspartikel enthält, entnommen und sterilfiltriert. Der Überstand mit den Viruspartikeln wurde danach entweder direkt für eine Transduktion verwendet oder es erfolgte die Lagerung bei -80°C .

2.2.2.7.2 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Virustiters und der „Multiplicity of infection“ (MOI) erfolgte mit Hilfe von 293T-Zellen. Dazu wurden 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 500 µl in einer 24-Loch-Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Virusüberstandes in Verdünnungen von 1:10 (50 µl) und 1:100 (5 µl). Zu den Ansätzen wurde

außerdem noch jeweils 1 µl Polybrene (4 mg/ml; Sigma, Taufkirchen) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37° C wurde die Transduktionseffizienz durch eine FACS-Analyse bestimmt. Die Berechnung des Virustiters und der MOI wurde nach der Formel von Stefan Stein (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt:

Virustiter:

2×10^5 293T-Zellen x (Prozentsatz der GFP-positiven Zellen : 100) x Verdünnung = Y x 10^5

MOI:

Virustiter : Anzahl der Zielzellen

2.2.2.7.3 Transduktion von eukaryotischen Zellen

Für die lentivirale Transduktion wurden jeweils 3×10^5 Zellen in einer 12-Loch-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die aufgetauten und getiterten Virusüberstände mit einer MOI von 0,2 bis 2 zu den Zellen gegeben. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von je 3 µl Polybrene (4 mg/ml), um die Anheftung der Viruspartikel an die Zellen zu fördern. Anschließend wurden die Zellkulturschalen für 15 Minuten bei 2.500 x g zentrifugiert und für vier Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Abnahme des Überstandes und die Zugabe von je 1 ml/well frischen Mediums. Die Zellen wurden über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die zweite Runde der Transduktion, wie bereits beschrieben. Anschließend wurden die Zellen weiterkultiviert. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte mit Hilfe der FACS-Analyse.

2.2.2.7.4 FACS-Analyse

Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte durch Messung der Koexpression von GFP (Green fluorescent protein) in den transduzierten Zellen. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen zwei bis drei Tage vor der Analyse in einer 6-Loch-Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA

behandelt und nach dem Ablösen in Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.500 x g und das einmalige Waschen der Zellen mit PBS. Danach wurden die Zellen in 200 bis 500 µl PBS resuspendiert. Die Detektion des GFP wurde im FL-1-Kanal des FACS-Calibur oder des FACS-Scan (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 NETN2-Gesamtzellextrakte

Lösungen:

- NETN2-Lysepuffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml PBS abgeschabt. Nach der Zentrifugation (1.000 x g, 5 min, 4° C) wurde das Zellsediment mit einem geeigneten Volumen NETN2-Lysepuffer (ca. 5-faches Volumen des Zellsedimentes), der mit den Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 und 2 und dem Proteaseinhibitor-Mix „Complete“ versetzt wurde, resuspendiert. Nach der Inkubation von 10 Minuten auf Eis, erfolgte zur Entfernung der Zelltrümmer die Zentrifugation (22.000 x g, 10 min, 4° C). Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° C oder -80° C gelagert.

2.2.3.2 Zellextrakte für Reporteragen-Experimente

Lösungen:

- Lysepuffer:

25 mM Glycylglycin pH 7,8, 8 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 15% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) Triton X-100

Die Kultivierung der Zellen für Reporteragen-Experimente erfolgte in 12-Loch-Zellkulturschalen. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und nach Zugabe von jeweils 1 ml kaltem PBS abgeschabt. Nach der Überführung in 1,5

ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße erfolgte die Zentrifugation (1.000 x g, 5 min, 4° C) und die Resuspension in 50 µl Lysepuffer. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis erfolgte die Zentrifugation (16.000 x g, 10 min, 4° C) und die Überführung der Zelllysate in neue Reaktionsgefäße. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20° C.

2.2.3.3 Bestimmung der Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität

Lösungen:

- Luziferase-Reaktionslösung:

20 mM Tricine/NaOH pH 7,8 , 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4 \times \text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 2,67 mM MgSO_4 , 0,1 mM EDTA, 33 mM DTT, 270 µM Coenzym A, 470 µM Luziferin, 530 µM ATP

- β -Galaktosidase-Reaktionslösung

1 mM MgCl_2 , 100 mM NaPO_4 , pH 8,0, 1% (v/v) Galacton

- Verstärkerlösung

200 mM NaOH, 10% (v/v) Emerald Lumineszenz-Verstärker

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden jeweils 10 µl Zellextrakt in ein Loch einer weißen 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und in einem Luminometer (MicroLumat LB96 P, EG&G Berthold, Bad Wildbad) nach Zugabe von je 50 µl Luziferase-Reaktionslösung analysiert. Dabei oxidiert die Luziferase in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen das Luziferin, wobei es zur Emission von Licht einer Wellenlänge von 562 nm kommt. Das emittierte Licht wurde 30 Sekunden nach der Injektion des Luziferins detektiert.

Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden jeweils 3,3 µl des Zellextraktes zu 33,3 µl der β -Galaktosidase-Reaktionslösung in einem Loch einer weißen 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte lichtdicht abgedeckt und für 45 Minuten schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Lichtemission erfolgte nach den gleichen Einstellungen wie die Bestimmung der Luziferase-Aktivität in einem Luminometer nach Injektion von jeweils 50 µl Verstärkerlösung. Die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten dienten dabei zur Normierung der bestimmten Luziferase-Aktivitäten.

Die Normierung erfolgte durch die Multiplikation des jeweiligen Luziferase-Wertes mit dem Quotienten der durchschnittlichen β -Galaktosidase-Aktivität (Mittelwert aller β -Galaktosidase-Aktivitäten eines Transfektionsansatzes) und der jeweils entsprechenden β -Galaktosidase-Aktivität der Probe. Für jede

Messung wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und ausgewertet.

2.2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Extrakten wurde mit Hilfe der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Als Eichprotein zur Erstellung einer Standardreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 0,1 µg/µl eingesetzt. Dazu wurden in Doppelbestimmungen in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte BSA mit einer steigenden Proteinmenge (0-5 µg) in jeweils 150 µl Wasser pipettiert. Von den zu bestimmenden Proteinlösungen wurden in einer Doppelbestimmung jeweils 1 µl zu 149 µl Wasser gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Biorad-Färbelösung (BIO-RAD Protein-Assay (Biorad, München)) zu jedem Ansatz und die Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung der Absorption der Proben erfolgte photometrisch mit einem ELISA-Reader (Spectra Max 340 (MWG Biotech, München)) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Mit Hilfe der BSA-Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen:

- 4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8 eingestellt mit HCl

- 4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8 eingestellt mit HCl

- SDS-Elektrophoresepuffer:

1,92 M Glycin, 0,248 M Tris/HCl, 10 g/l SDS

- APS-Lösung:

10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Zusammensetzung eines SDS-Gels:

Trenngel	8%	10%	12 %
30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid	2 ml	2,5 ml	3 ml
Trenngelpuffer	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
H ₂ O	3,625 ml	3,125 ml	2,625 ml
APS-Lösung	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Sammelgel	(2 Gele)
30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid	650 µl
Sammelgelpuffer	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
APS-Lösung	25 µl
TEMED	5 µl

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) eingesetzt. Dazu wurde das Mini-Protean II-Gelelektrophoresesystem von Biorad, München verwendet. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook (1989). Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Elektrophoresepuffer verwendet. Das aufzutrennende Proteingemisch wurde mit 4x Proteinauftragspuffer versetzt und 2-5 Minuten bei 95° C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze in die Taschen des Sammelgels gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung wurde zunächst bei 80 V begonnen und nach dem Eintritt der Proben in das Trenngel auf 100-140 V erhöht.

2.2.3.6 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Lösungen:

- Coomassie-Färbelösung:

40% (v/v) Ethanol, 10% (w/v) Essigsäure, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau

- Coomassie-Entfärbelösung:

40% (v/v) Ethanol, 10% (w/v) Essigsäure

Die Färbung der aufgetrennten Proteine im Trenngel erfolgte mit der Coomassie-Färbelösung für 1 Stunde oder über Nacht. Die Entfärbung des Trenngeles erfolgte anschließend in der Coomassie-Entfärbelösung über Nacht oder für mehrere Stunden mit mehrmaligem Wechseln der Lösung. Danach wurden die Gele in Wasser inkubiert und zwischen Zellophanfolie im Geltdrockner bei 80° C für 2 Stunden getrocknet.

2.2.3.7 Western-Blot-Analysen und Immunodetektion

Lösungen:

- Kathodenpuffer:

25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 10% (v/v) Methanol

- Anodenpuffer I:

300 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol

- Anodenpuffer II:

25 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol

- TBST:

10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20

- Blockierlösung:

5% (w/v) Magermilchpulver in TBST

Nach der Auftrennung der Proteine durch eine SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und anschließend bestimmte Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Der Western-Blot-Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines Halb-Trockenblotgerätes (QWL) der Firma Peqlab, Erlangen mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems, bestehend aus Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II. Es wurden PVDF-Membranen (Millipore, Eschborn) und Gel-Blotting-Papiere der Firma Schleicher & Schuell, Dassel verwendet. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 1,6 mA/cm² mit folgendem Aufbau:

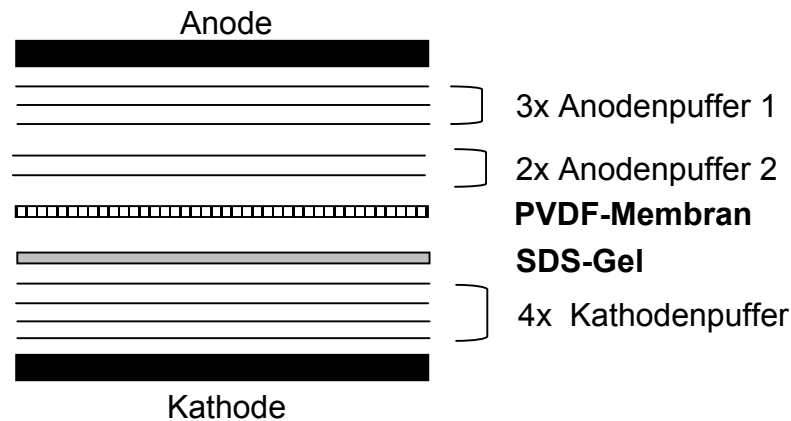


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Western-Blot-Transfers

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte zur Absättigung der noch freien Bindestellen, die Inkubation der Membran in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zum Nachweis spezifischer Proteine wurde die Membran anschließend mit dem entsprechenden Antikörper (in Blockierlösung) über Nacht bei 4° C inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundenen Antikörpers erfolgte das dreimalige Waschen (jeweils 5 Minuten) in TBST. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection System der Firma Amersham Biosciences, Freiburg nach Angaben des Herstellers. Die Signale wurden mit Röntgenfilmen (Fuji Medical X-Ray Film, Fuji Film, Düsseldorf) detektiert.

2.2.3.8 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen

Lösungen:

- Strippingpuffer:

62,5 mM Tris/HCl pH 6,7, 2% (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

Zur Entfernung, der an einer Membran gebundenen Antikörper für die erneute Inkubation mit einem weiteren Antikörper, wurde die Membran mit 20 ml Strippingpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

erfolgte das dreimalige Waschen für 5 Minuten mit TBST und die Inkubation für eine Stunde mit Blockierlösung. Danach konnte die Zugabe des Antikörpers in Blockierlösung und das Vorgehen wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben, erfolgen.

2.2.3.9 Immunopräzipitation

Lösungen:

- NETN2-Lysepuffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin

Die Immunopräzipitation (IP) wurde zur Analyse von Proteinkomplexen in eukaryotischen Zellen eingesetzt. Für jeden IP-Ansatz wurden jeweils 2×10^6 Zellen auf einer 10 cm-Petrischale für nachfolgende Transfektionen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.6.1 beschrieben mittels der Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode. Die Herstellung der Zellextrakte wurde wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt und die Zellen in 500 μ l NETN2-Lysepuffer (versetzt mit Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 und 2 und dem Proteaseinhibitor-Mix „Complete“) aufgenommen. Bei der späteren Verwendung des Anti-FLAG M2 Affinity-Gels (Sigma, Taufkirchen) wurde dem NETN2-Lysepuffer kein DTT zugegeben. Die Zellextrakte wurden anschließend zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine mit Protein A/G PLUS-Agarose bzw. Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) für mindestens eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte zur Sedimentation der Agarose die Zentrifugation (22.000 x g, 10 min, 4° C). Der Überstand wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und jeweils 1% als Input-Kontrolle entnommen. Es erfolgte die Zugabe des Antikörpers (1:250 verdünnt) oder je 4 μ g/Ansatz bzw. von jeweils 25 μ l des Anti-FLAG M2 Affinity-Gels zu den Überständen und die Inkubation bei 4° C über Nacht auf dem Rotator (16 rpm). Bei Verwendung eines anderen Antikörpers als des Anti-FLAG M2 Affinity-Gels erfolgte danach die Zugabe von jeweils 25 μ l Protein A/G PLUS-Agarose und die weitere Inkubation für 2-3 Stunden. Anschließend wurde die Agarose sedimentiert (500 x g, 1 min, 4° C) und drei Mal mit NETN2-Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe

von jeweils 30 µl 2x Proteinauftragspuffer wurden die Proben mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert.

2.2.3.10 Expression von GST-Fusionsproteinen und Herstellung von Rohlysaten

Lösungen:

- Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) Glycerin

Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen wurden verschiedene GST-Gen-Fusionsvektoren der pGEX-Reihe (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Dadurch können fremde Polypeptide in *Escherichia coli* als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert werden (Smith and Johnson, 1988). Durch die Verwendung dieses Systems wird eine induzierbare Expression ermöglicht und eine affinitätschromatographische Aufreinigung des nativen Fusionsproteines mit Hilfe immobilisierten Glutathions.

Für die Expression des gewünschten GST-Fusionsproteines erfolgte zunächst die Transformation des *E. coli*-Stammes BL 21 (DE3) pLysS. Eine Vorkultur mit einem Volumen von 10 ml LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 ml LB-Selektivmedium mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37° C auf dem Schüttler bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,6 inkubiert. Die Induktion der Expression der GST-Fusionsgene erfolgte durch Zugabe von 1 M Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG, Endkonzentration: 1 mM). Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden wurden die Bakterien sedimentiert (3.000 x g, 20 min, 4° C). Die Resuspension der Bakterien erfolgte anschließend in 10 ml Lysepuffer, der 1 mM DTT und den Proteaseinhibitor „Complete“ (Roche, Mannheim) enthielt. Die Lyse der Bakterien wurde durch dreimaliges Frieren (in flüssigem Stickstoff) und Tauen (37° C im Wasserbad) erreicht. Die Fragmentierung der Nukleinsäuren erfolgte danach durch die Behandlung mit Ultraschall (2 x 20 sec, Duty Cycle: 75%, Output Control: 4,5; Branson Sonifier W-250, G. Heinemann, Schwäbisch Gemünd). Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde das Rohlysate zentrifugiert

(165.000 x g, 30 min, 4° C). Der geklärte Überstand (Rohlysat) wurde anschließend in ein 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Es wurde danach entweder direkt für eine nachfolgende Aufreinigung eingefroren (Lagerung: -20° oder -80° C) oder aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.2.3.11 Reinigung und Dialyse von GST-Fusionsproteinen

Lösungen:

- Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) Glycerin

- Lysepuffer, detergentfrei:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin

- Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte zunächst die Herstellung von Rohlysaten, wie in Abschnitt 2.2.3.10 beschrieben. Das geklärte Rohlysat wurde mit 300 µl mit durch Lysepuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) für eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm) inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls bei 4° C durchgeführt. Die Suspension wurde auf eine Poly-Prep Chromatography-Säule (Biorad, München) gegeben und der Säulendurchfluss gesammelt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine erfolgte das dreimalige Waschen des Säulenmaterials mit jeweils 10 ml Lysepuffer und danach das dreimalige Waschen mit jeweils 10 ml detergentfreiem Lysepuffer. Die Elution der gebundenen GST-Fusionsproteine erfolgte schließlich in 10 Schritten mit jeweils 400 µl Elutionspuffer. Jeweils 10 µl jeder Fraktion wurden zur Kontrolle entnommen und nach Zugabe von jeweils 10 µl 2x Proteinauftragspuffer durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine nachfolgende Coomassie-Färbung der Proteine analysiert.

Die Fraktionen mit der höchsten GST-Fusionsproteinmenge wurden anschließend gegen einen geeigneten Puffer mit Hilfe des Dialyseschlauches VISKING Typ 20/32 (Ausschlussgrenze (MWCO) 14.000 Da; Roth, Karlsruhe) über Nacht bei 4° C dialysiert.

2.2.3.12 Spaltung eines GST-Fusionsproteines durch die TEV-Protease

Lösungen:

- TEV-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT

- DNTV-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol

Für die spezifische Spaltung eines gewünschten GST-Fusionsproteines, wodurch es zur Entfernung der Glutathion-S-Transferase (GST) kommt, wurde der GST-Gen-Fusionsvektor pGEX-2-TEV (von Stefan Becker, Max-Planck-Institut, Göttingen) verwendet. Dieser Vektor enthält hinter dem GST und vor der multiplen Klonierungsstelle eine spezifische Erkennungssequenz für die TEV-Protease (Tobacco Etch Virus, Aminosäure-Sequenz der Erkennungssequenz: ENLYFQ*G), die eine Abspaltung ermöglicht.

Nach der Herstellung des Rohlysates (siehe Abschnitt 2.2.3.10) und der anschließenden Reinigung des Fusionsproteines (siehe Abschnitt 2.2.3.11) erfolgte die Dialyse der entsprechenden Fraktionen gegen TEV-Puffer über Nacht bei 4° C. Danach erfolgte zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge eine Proteinbestimmung wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben. Die spezifische Spaltung des GST-Fusionsproteines erfolgte mit 5 µg der TEV-Protease zu jeweils 100 µg des GST-Fusionsproteines für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Zur Kontrolle der vollständigen Abspaltung wurden jeweils vor und nach der Abspaltungsreaktion 5 µg des GST-Fusionsproteines abgenommen. Ein zusätzlicher Kontrollansatz erfolgte mit 5 µg ohne Zugabe der TEV-Protease und Inkubation für 18 Stunden bei Raumtemperatur. Die Analyse dieser Proben wurde durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine nachfolgende Coomassie-Färbung vorgenommen.

Zur Entfernung des abgespaltenen GST und der TEV-Protease erfolgte die Inkubation des Spaltansatzes mit einer 1:1 Mischung aus Glutathion-Sepharose (Entfernung des GST) und Ni-NTA-Agarose (Entfernung der His-markierten TEV-Protease). Aus diesem Grund wurde der Spaltansatz zunächst gegen DNTV-Puffer über Nacht bei 4° C dialysiert. Dabei musste beachtet werden, ob das erhaltene Molekulargewicht des Spaltungsproduktes unterhalb der Ausschlussgrenze des Dialyseschlauches VISKING Typ 20/32 (Ausschlussgrenze (MWCO) 14.000 Da; Roth, Karlsruhe) lag. Im Falle eines

kleineren Spaltungsproduktes wurde der Dialyseschlauch Spectra/Por Biotech RC Membranes (3,500) (Ausschlussgrenze (MWCO) 3.500 Da; Spectrum Europe BV, Breda (Niederlande)) verwendet. Zur Kontrolle erfolgte die Abnahme einer Probe (10 µg Protein) vor der Dialyse. Der dialysierte Spaltansatz wurde mit 400 µl eines äquilibrierten 1:1-Gemisches aus Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) und Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) für eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Poly-Prep Chromatography-Säule (Biorad, München) gegeben und der Säulendurchfluss (=Spaltansatz) gesammelt. Um noch in der Säule verbliebenes Protein zu gewinnen erfolgte zusätzlich noch die Zugabe von fünf Mal je 400 µl DNTV-Puffer. Jeweils 10 µg Protein vor und nach der Entfernung des GST und der TEV-Protease und jeweils 40 µl der Fraktionen wurden zur Kontrolle durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine nachfolgende Coomassie-Färbung überprüft.

Nach erfolgter Kontrolle wurden der Spaltansatz und geeignete Fraktionen gegen einen, für spätere Anwendungen gewünschten, Puffer über Nacht bei 4° C dialysiert.

2.2.3.13 Expression, Herstellung von Rohlysaten, Reinigung, Dialyse und TEV-Protease-Spaltung von Poly-His-Fusionsproteinen

Lösungen:

- Lysepuffer/WP1:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,9

- Waschpuffer 2:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 7,9

- His-Elutionspuffer 1:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 7,9

- His-Elutionspuffer 2:

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,9

Die Herstellung von Poly-His-Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe von Vektoren, die auf dem pET-Vektorsystem (Novagen, Darmstadt) basieren und zusätzlich eine Erkennungssequenz der TEV-Protease besitzen (siehe auch Abschnitt 2.2.3.12). Die Expression der Fusionskonstrukte erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL 21 (DE3) Codon Plus RIL. Nach der Transformation der Bakterien wurde

über Nacht eine Vorkultur mit LB-Medium, das mit Ampicillin versetzt wurde, bei 37° C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Für die Expression wurden 500 ml LB-Selektionsmedium mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37° C auf dem Schüttler bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,4 inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Expressionskultur bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,72 bei 23° C. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 M IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden wurde die Bakterienkultur sedimentiert (3.000 x g, 20 min, 4° C) und das Sediment bei -20° C gelagert. Die Herstellung der Rohlysate erfolgte durch Resuspension der Bakterien in 15 ml Lysepuffer/WP1, der den Proteaseinhibitor „Complete“ (Roche, Mannheim) und PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) enthielt. Die Lyse der Bakterien erfolgte anschließend durch Ultraschall-Behandlung (8 x 25 sec, Duty Cycle: 90%, Output Control: 4,5; Branson Sonifier W-250, G. Heinemann, Schwäbisch Gemünd). Die Entfernung der Zelltrümmer und die Lagerung des Rohlysates wurde wie in Abschnitt 2.2.3.10 durchgeführt.

Zur Reinigung wurde das Rohlysat mit 1 ml äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) für eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm) inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte mit Abweichungen wie in Abschnitt 2.2.3.11 beschrieben. Das Waschen des Säulenmaterials erfolgte dabei jeweils zweimal mit Lysepuffer/WP1 und Waschpuffer 2, während die Elution in jeweils 7 Schritten mit je 2 ml His-Elutionspuffer 1 und anschließend His-Elutionspuffer 2 durchgeführt wurde. Die Kontrolle erfolgte mit jeweils 40 µl jeder Fraktion. Die Fraktionen mit den größten Poly-His-Fusionsproteinmengen wurden anschließend gegen TEV-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.3.12) mit Hilfe des Dialyseschlauches Spectra/Por Biotech RC Membranes (3,500) (Ausschlussgrenze (MWCO) 3.500 Da; Spectrum Europe BV, Breda (Niederlande)) über Nacht bei 4° C dialysiert. Die anschließende Spaltung des Fusionsproteines durch die TEV-Protease und die nachfolgenden Schritte wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.12 beschrieben, mit einer Abweichung, durchgeführt. Der dialysierte Spaltansatz wurde dabei zur Entfernung der TEV-Protease und des abgespaltenen Poly-His nur mit Ni-NTA-Agarose inkubiert.

2.2.3.14 *In vitro*-Transkription/Translation

Für die *in-vitro*-Transkription und gekoppelte Translation mit Plasmid-DNA als Matrizen-DNA in Gegenwart von ^{35}S -Methionin wurde das TnT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim) für SP6- oder T7-Promotoren verwendet. Die Durchführung einer Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit 2 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 90 Minuten bei 30° C. Nach der Inkubationszeit wurden 2 µl der Reaktion zur Kontrolle entnommen und der restliche Reaktionsansatz mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.2.3.15 GST-Interaktionsstudien

Lösungen:

- Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) Glycerin

- TIF-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) NP-40

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden GST-Interaktionsstudien durchgeführt. Ein Interaktionspartner wurde dabei als GST-Fusionsprotein, an Glutathion-Sepharose gebunden, vorgelegt. Der zweite Interaktionspartner war ein *in vitro*-transkribiertes/translatiertes und ^{35}S -Methionin, radioaktiv-markiertes Protein und wurde zugegeben.

Die Expression von GST bzw. den GST-Fusionsproteinen und die Herstellung der Rohlysate erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.10 beschrieben. Die *in-vitro*-Transkription und gekoppelte Translation mit ^{35}S -Methionin, zur radioaktiven Markierung wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.14 beschrieben, durchgeführt. Zu den verwendeten Puffern wurde in den nachfolgenden Schritten der Proteaseinhibitor „Complete“ (Roche, Mannheim) zugegeben.

Zunächst erfolgte die Äquilibration von jeweils 15 µl Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) mit Lysepuffer. Anschließend wurden die GST-Fusionsproteine oder GST als Kontrolle (jeweils 20 µg, bei Wettbewerbs-Experimenten jeweils 10 µg) zu der äquilibrierten Glutathion-Sepharose gegeben, auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit Lysepuffer gebracht und für

eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze zentrifugiert (500 x g, 1 min, 4° C) und zwei Mal mit Lysepuffer und drei Mal mit TIF-Puffer gewaschen. Zur Untersuchung der Proteininteraktionen erfolgte die Zugabe der radioaktiv-markierten Proteine in 200 µl TIF-Puffer. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4° C auf dem Rotator (16 rpm). Bei Kompetitionsexperimenten erfolgte vor der Zugabe die vorherige Inkubation der *in vitro*-translatierten Proteine mit den jeweiligen Peptiden für mindestens 15 Minuten.

Nach dreimaligem Waschen mit TIF-Puffer wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von jeweils 20 µl 2x Proteinauftragspuffer eluiert. Nach der Denaturierung (5 min, 95° C) wurden jeweils $\frac{3}{4}$ eines Ansatzes durch Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Zusätzlich dazu erfolgte die Auftragung von jeweils 10% jedes eingesetzten *in vitro*-translatierten Proteines als Kontrolle. Die radioaktiven Proteine wurden durch Autoradiographie bzw. Fluorographie visualisiert. Jeweils $\frac{1}{4}$ jedes Ansatzes wurde auf ein weiteres SDS-Gel gegeben. Durch die nachfolgende Coomassie-Färbung wurde die Menge des gebundenen GST bzw. der GST-Fusionsproteine abgeschätzt und untereinander verglichen.

Die Quantifizierung der GST-Interaktionsstudien erfolgte mit Hilfe des Szintillationszählers (TRI-CARB 1500 Liquid Scintillation Analyzer, Canberra Packard, Frankfurt/Main). Dazu wurde die in den Reaktionsgefäßen verbliebene Radioaktivität nach Abnahme und Auftragung des Überstandes bestimmt. Außerdem wurden zusätzlich 10% des eingesetzten *in vitro*-translatierten Proteines gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem der erhaltene Messwert des *in vitro*-translatierten Proteines mit folgender Formel in Bezug zu den Messwerten der Versuchsproben gesetzt wurde:

$$(1 : \text{Messwert}_{10\% \text{ in vitro-translatiertes Protein}}) \times \text{Messwert}_{\text{Versuchsprobe}} = \text{Relative Radioaktivität}$$

Relative Radioaktivität in cpm (counts per minute)

2.2.3.16 Detektion von ^{35}S -markierten Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen durch Autoradiographie und Fluorographie

Der Nachweis von ^{35}S -markierten Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte mittels Autoradiographie und Fluorographie. Die Autoradiographie beruht auf der Schwärzung eines Röntgenfilms durch die energiereiche Strahlung radioaktiver Proben. Zur Verstärkung der Empfindlichkeit der Autoradiographie wird die Fluorographie eingesetzt. Dabei wird das Gel mit der Lösung eines Fluorophors getränkt und nach der Trocknung, wie bei der Autoradiographie, exponiert.

Für die autoradiographische bzw. fluorographische Detektion der radioaktiv-markierten Proteine wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele nach Beendigung der Auftrennung zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 10% (v/v) Essigsäure inkubiert. Danach erfolgte bei einem fluorographischen Nachweis die weitere Inkubation für 30 Minuten in Amplify (Amersham Biosciences, Freiburg). Bei einem autoradiographischen Nachweis wurde dieser Schritt übersprungen. Die Trocknung der Gele erfolgte anschließend auf einem Filterpapier im Geltrockner für zirka eine Stunde bei 80°C . Zur Detektion der Signale wurden die getrockneten Gele dann über Nacht zusammen mit einer Verstärkerfolie bei -80°C auf Röntgenfilmen (Fuji Medical X-Ray Film, Fuji Film, Düsseldorf) exponiert.

2.2.3.17 Bestimmung der Affinitätskonstanten mittels des BIACORE-Systems

Lösungen:

- HBS-EP-Puffer (Biacore AB, Freiburg):

10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) Polysorbate 20 (P20)

- SB+P20-Puffer:

50 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,005% (v/v) Polysorbate 20 (P20)

- TIF-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) NP-40

- Regenerations-Lösung (Biacore AB, Freiburg):

10 mM Glycin, pH 2,2

Mit Hilfe des BIACORE-Systems können Wechselwirkungen zwischen Molekülen in Echtzeit gemessen werden. Die Messmethodik basiert dabei auf

dem Surface Plasmon Resonance (SPR)-Phänomen, das die Detektion der Änderung der Masse über einer biospezifischen Oberfläche ermöglicht. Dadurch können Interaktionen zwischen verschiedenartigen Molekülen (Proteine, DNA, RNA u.a.) untersucht werden, ohne dass eine Markierung der beteiligten Moleküle notwendig ist. Eine Messung erfolgt indem ein Interaktionspartner (Ligand) auf einem mit carboxymethylierten Dextran beschichteten Goldplättchen (Sensorchip) direkt oder indirekt (über ein Fängermolekül, z.B. ein Antikörper) immobilisiert wird. Anschließend wird der zweite Interaktionspartner (Analyt) in das Flusssystem injiziert. Er fließt in einer Flusszelle über die Oberfläche und bindet im Idealfall an den Liganden. Dabei misst eine Optik zu jedem Zeitpunkt der Interaktionsstudie mit Hilfe der SPR die Masse über der Oberfläche, die bei der Bindung des Analyten an den Liganden zunimmt. BIACORE-Messungen ermöglichen damit unter anderem die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten und somit die Berechnung der Affinitätskonstanten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit dem BIACORE-X-Gerät der Firma Biacore AB (Freiburg). Das BIACORE-X-Gerät enthält zwei Flusszellen (Fc1 und Fc2), die einzeln oder gemeinsam in Serie angewählt werden können. Die Immobilisierung des Liganden erfolgte indirekt auf einem Sensorchip CM5. Dazu wurde ein Anti-GST-Antikörper (Biacore AB, Freiburg) über die Aminkopplungs-Prozedur kovalent über die Amingruppen an den Sensorchip immobilisiert. Als Laufpuffer wurde dazu HBS-EP-Puffer bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Der CM5-Sensorchip wurde eingesetzt und die Aminkopplungs-Prozedur gestartet. Die Immobilisierung des Anti-GST-Antikörpers erfolgte in beiden Flusszellen mit Hilfe des „GST Kit for fusion capture“ der Firma Biacore AB (Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Die Überprüfung der Aktivität des Antikörpers erfolgte mit rekombinantem GST (Biacore AB, Freiburg) in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in HBS-EP-Puffer nach den Angaben des Herstellers. Nach Abschluss der Überprüfung erfolgte die vollständige Regeneration der Flusszellen vom gebundenen GST. Bei den Interaktionsmessungen wurde als Laufpuffer der SB+P20-Puffer oder TIF-Puffer eingesetzt und eine Temperatur von 25° C eingestellt. Zunächst erfolgte die Injektion des Liganden (GST-Fusionsprotein) in Flusszelle Fc2 in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im entsprechenden Laufpuffer und bei einer

Flussrate von 5 µl/min. Die Menge des zu immobilisierenden Liganden wurde in Abhängigkeit des Verhältnisses der Molekulargewichte der beiden Interaktionspartner gewählt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$R_{\max} = (Mw_a : Mw_l) \times R_i \times s$$

R_{\max} : maximaler RU-Wert

Mw_a : Molekulargewicht des Analyten

Mw_l : Molekulargewicht des Liganden

R_i : Menge des zu immobilisierenden Liganden

s: Stöchiometrie der Interaktion

Dabei sollte durch die Bindung des Analyten an den Liganden ein maximaler RU (Response Unit)-Wert (R_{\max}) von 100-200 RU erreicht werden. Anschließend erfolgte die Injektion des Analyten (60 µl) in beide Flusszellen (Fc1 und Fc2) in verschiedenen Konzentrationen im gleichen Laufpuffer. Die Injektion wurde bei einer Flussrate von 20 µl/min für 180 Sekunden durchgeführt. Zur besseren Auswertung der Interaktionsmessungen erfolgte nach Abschluss der Injektion eine Verzögerung von 300 Sekunden vor Beginn des Waschschrilles. Die Flusszelle 1 fungiert bei den Messungen als Kontroll-Flusszelle, in der kein Ligand immobilisiert wurde und die unspezifische Bindungseffekte des Analyten an den Sensorchip zeigt. Die Flusszelle 2 ist die Mess-Flusszelle, in der die Interaktion zwischen dem Liganden und dem Analyt erfolgt. Das Signal der Interaktion ergibt sich dann aus der Differenz zwischen dem Signal der Mess-Flusszelle und der Kontroll-Flusszelle. Die Regeneration der Flusszellen erfolgte mit der Regenerations-Lösung bei einer Flussrate von 5 µl/min bis zur vollständigen Regeneration der Flusszellen. Die Auswertung der Interaktionsmessungen wurde mit Hilfe der „BIAevaluation Software, Version 4.1“ (Biacore AB, Freiburg) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen Mitgliedern der NCoA-Koaktivator-Familie

3.1.1 Interaktion von NCoA-Proteinen in Zellen

Die NCoA (Nuclear receptor coactivator)- oder SRC (Steroid receptor coactivator)-Proteine bilden eine Familie von Koaktivator-Proteinen. Verschiedene Publikationen konnten eine Interaktion zwischen Proteinen der NCoA-Familie untereinander, jedoch nur indirekt, in Gelfiltrationsversuchen (McKenna et al., 1998) oder Chromatin-Immunopräzipitationen (Zhang et al., 2004b) demonstrieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GRIP1 (NCoA-2) über die C-terminale Region homodimerisieren kann (Liu et al., 2006). Eine direkte Interaktion zwischen zwei verschiedenen NCoA-Proteinen konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Um die Interaktion verschiedener NCoA-Proteine im Rahmen dieser Arbeit nachzuweisen, wurden Koimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 293T- und LnCap-Zellen verwendet. Nach der Herstellung von Gesamtzellextrakten, erfolgte die Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen NCoA-1 oder NCoA-3. Zur Kontrolle erfolgte zusätzlich der Einsatz eines unspezifischen IgG-Antikörpers. Alle Ansätze wurden schließlich durch eine SDS-Gelelektrophorese und einem Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern gegen NCoA-3 oder NCoA-1, entsprechend umgekehrt zu den Immunopräzipitationsansätzen, analysiert (Abb. 3.1). Die Abschätzung der präzipitierten Proteinmenge erfolgte, indem jeweils 1% des für die Immunopräzipitation eingesetzten Gesamtzellextraktes vor der Immunopräzipitation (IP) entnommen und parallel auf dem Gel analysiert wurde.

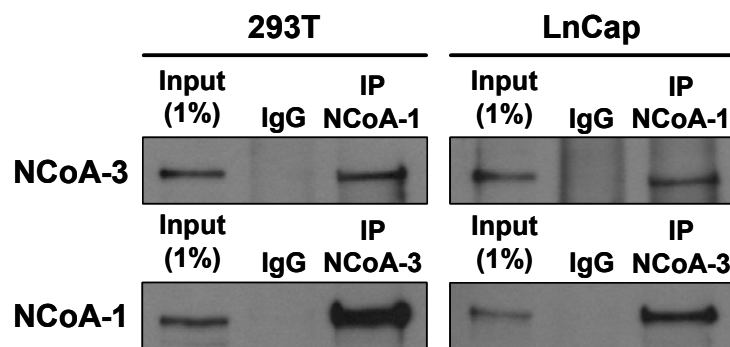


Abb. 3.1 NCoA-Proteine interagieren in Zellen

Nach der Herstellung von Gesamtzellextrakten aus 293T- und LnCap-Zellen, erfolgte die Immunopräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern gegen NCoA-1 oder NCoA-3 oder einem unspezifischen Antikörper (IgG). Die präzipitierten Proteine wurden durch eine SDS-PAGE und einem Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen NCoA-1 oder NCoA-3, entsprechend umgekehrt zu den IP-Ansätzen, analysiert. Zum Abschätzen der präzipitierten Proteinmenge erfolgte die parallele Analyse von jeweils 1% der Gesamtzellextrakte, die vor der IP entnommen wurden (Input).

In beiden Zelllinien konnte sowohl NCoA-3 mit NCoA-1, als auch NCoA-1 mit NCoA-3 koimmunopräzipitiert werden. Bei Verwendung des unspezifischen IgG-Antikörpers erfolgte in keinem der Ansätze eine Koimmunopräzipitation. Damit konnte eine Interaktion von endogenen NCoA-Proteinen in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden.

3.1.2 Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit den Volllängen-Proteinen der NCoA-Proteinfamilie *in vitro*

Bei der in den früheren Studien, durch Gelfiltrationsversuche und Chromatin-Immunopräzipitation, nachgewiesenen Assoziation von NCoA-Proteinen wurden andere Domänen postuliert, die die Interaktion vermitteln, als in der Untersuchung zur Homodimerisierung von NCoA-2. Die durch Liu et al. (2006) demonstrierte Homodimerisierung erfolgt über carboxyterminale Regionen. Im Gegensatz dazu wurde bis zu diesem Zeitpunkt postuliert, dass eine Interaktion über die aminoterminalen bHLH/PAS-Domänen vermittelt werden könnte. Dies lag darin begründet, dass bHLH/PAS-Regionen in verschiedenen Transkriptionsfaktoren bzw. Signaltransduktionsmolekülen beschrieben wurden,

in denen sie für eine Dimerisierung verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Familienmitglied NCoA-1 ein Koaktivator von STAT6 ist (Litterst and Pfitzner, 2001). Die Interaktion wird dabei durch die PAS-B-Domäne von NCoA-1 (AS 257-420) und einem LXXLL-Motiv (dabei steht L für Leucin und X für eine beliebige andere Aminosäure) in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 vermittelt (Litterst and Pfitzner, 2002 und Razeto et al., 2004). NCoA-Proteine enthalten in ihrer Aminosäure-Sequenz, ebenso wie STAT6 und einige andere Koaktivatoren (Heery et al., 1997), LXXLL-Motive. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die PAS-B-Domäne und LXXLL-Motive der NCoA-Proteine eine Rolle bei der Interaktion zwischen den NCoA-Proteinen spielen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden GST-Interaktionsstudien durchgeführt. Dazu wurde GST oder ein GST-Fusionsprotein des murinen NCoA-1, das die Aminosäuren 257-462 umfasst, an Glutathion-Sepharose gebunden und nach einigen Waschschritten mit radioaktiv-markiertem, *in-vitro*-transkribiertem/translatiertem murinen NCoA-1, NCoA-2 oder NCoA-3 inkubiert (Abb. 3.2).

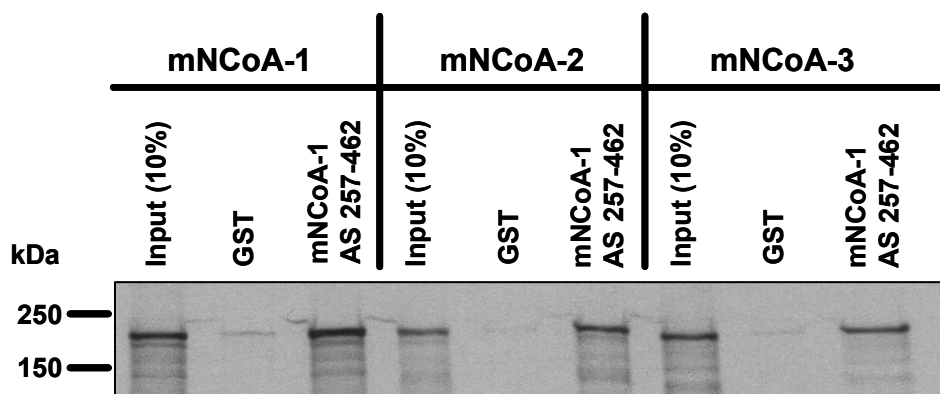


Abb. 3.2 Die PAS-B-Domäne des murinen NCoA-1 interagiert mit den Vollängen-Proteinen der NCoA-Familie *in vitro*

Bakteriell exprimiertes GST oder das Fusionsprotein GST-mNCoA-1 AS 257-462 wurde an Glutathion-Sepharose gebunden und mit [³⁵S]-Methionin-markiertem murinen NCoA-1, NCoA-2 oder NCoA-3 inkubiert. Die Analyse der Ansätze erfolgte nach der Elution mit Hilfe der SDS-PAGE und Fluorographie. Als Kontrolle (Input) wurden jeweils 10% des eingesetzten Retikulozytenlysates mit dem entsprechenden radioaktiv-markierten Protein aufgetragen.

Die Abbildung zeigte eine deutliche Interaktion des Fusionsproteins GST-mNCoA-1 AS 257-462 mit allen drei Mitgliedern der NCoA-Koaktivator-Familie

in vitro. Eine unspezifische Bindung an die GST-Kontroll-Ansätze ist nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt erstmals, dass der N-terminale Bereich von mNCoA-1, der die PAS-B-Domäne umfasst, die Interaktion mit NCoA-Koaktivator-Proteinen vermittelt.

3.1.3 Koimmunopräzipitation des Volllängen-NCoA-1 durch die NCoA-1-PAS-B-Domäne

Um die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und dem Volllängen-Protein aus den GST-Interaktionsstudien zu bestätigen und zu überprüfen, ob die Interaktion auch in lebenden Zellen stattfinden kann, wurde ein Koimmunopräzipitations-Experiment durchgeführt. Dazu wurden 293T-Zellen mit einem Expressionsvektor für das murine Volllängen-NCoA-1, zusammen mit einem YFP-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne des Ratten-NCoA-1 (AS 213-462) oder CFP, als Kontrolle, transfiziert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Immunopräzipitation mit einem Anti-GFP-Antiserum vorgenommen, das CFP und den YFP-Anteil erkennt. Die Analyse des kopräzipitierten NCoA-1 erfolgte durch eine SDS-PAGE und einem nachfolgenden Western-Blot mit einem Antikörper gegen NCoA-1 (Abb. 3.3). Zur Abschätzung der präzipitierten Proteinmenge wurde für jeden Ansatz 1%, des für die Koimmunopräzipitation eingesetzten Zellextraktes, vor der Immunopräzipitation entnommen und parallel analysiert.

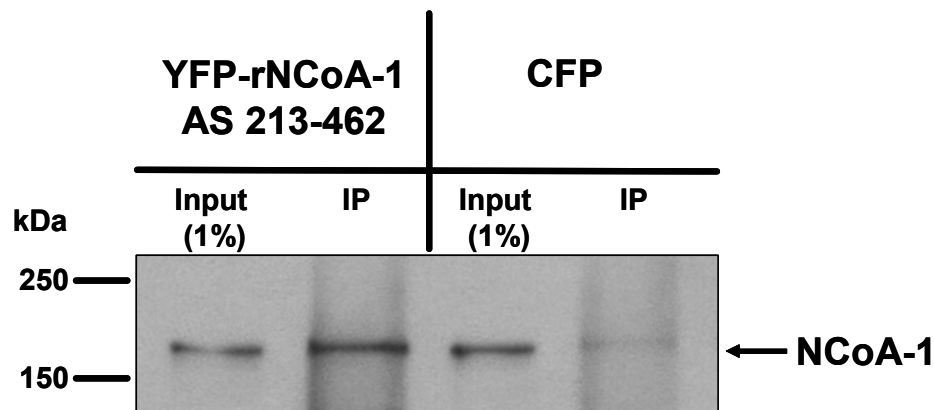


Abb. 3.3 Die PAS-B-Domäne von NCoA-1 interagiert mit dem Volllängen-NCoA-1 in 293T-Zellen

293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für ein YFP-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne des Ratten-NCoA-1 (rNCoA-1 AS 213-462) oder CFP, zusammen mit dem murinen Volllängen-NCoA-1 (jeweils 3 µg) transfiziert. Nach Präparation der Gesamtzellextrakte erfolgte eine Immunopräzipitation (IP) mit einem Anti-GFP-Antiserum, das CFP und den YFP-Anteil erkennt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE und einem Western-Blot mit einem Anti-NCoA-1-Antikörper analysiert. Zur Kontrolle wurden jeweils 1% der Zellextrakte gleichzeitig auf das SDS-Gel aufgetragen (Input).

Bei der durchgeführten Koimmunopräzipitation wurde das Volllängen-NCoA-1 nur mit dem YFP-Fusionsprotein, das die PAS-B-Domäne des Ratten-NCoA-1 enthält, präzipitiert. Die Expression des CFP-Proteines ohne Fusionsanteil ermöglichte keine Kopräzipitation. Dieses Experiment zeigt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit dem Volllängen-Protein in Zellen interagieren kann und unterstützt damit die *in-vitro*-Ergebnisse aus den GST-Interaktionsstudien.

3.1.4 Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit spezifischen LXXLL-Motiven

Die bisherigen Versuche konnten erstmals eine direkte Interaktion von NCoA-Proteinen über eine aminoterminalen Region miteinander zeigen. Um zu untersuchen welche Region von NCoA-1 die Interaktion mit der PAS-B-Domäne vermittelt und ob LXXLL-Motive damit an der Interaktion beteiligt sind, wurden weitere Interaktionsstudien vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 257-462 von mNCoA-1 in GST-

Interaktionsstudien zusammen mit radioaktiv-markierten Fragmenten von NCoA-1 eingesetzt und deren Bindung untersucht. Die eingesetzten Fragmente repräsentierten dabei die verschiedenen Regionen von NCoA-1, die LXXLL-Motive enthalten: die Nuclear-Receptor-Interaktion-Domäne (NID), die drei LXXLL-Motive enthält, die CBP-Interaktions-Domäne (CID/AD1), die zwei LXXLL-Motive enthält und die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne AD2 mit einem LXXLL-Motiv (Abb. 3.4 A). Als Positiv-Kontrolle für eine Interaktion mit der PAS-B-Domäne wurde ein radioaktiv-markiertes Fragment verwendet, das einen Teil der Transaktivierungsdomäne von STAT6 umfasst (AS 792-847) und das NCoA-1-interagierende LXXLL-Motiv enthält.

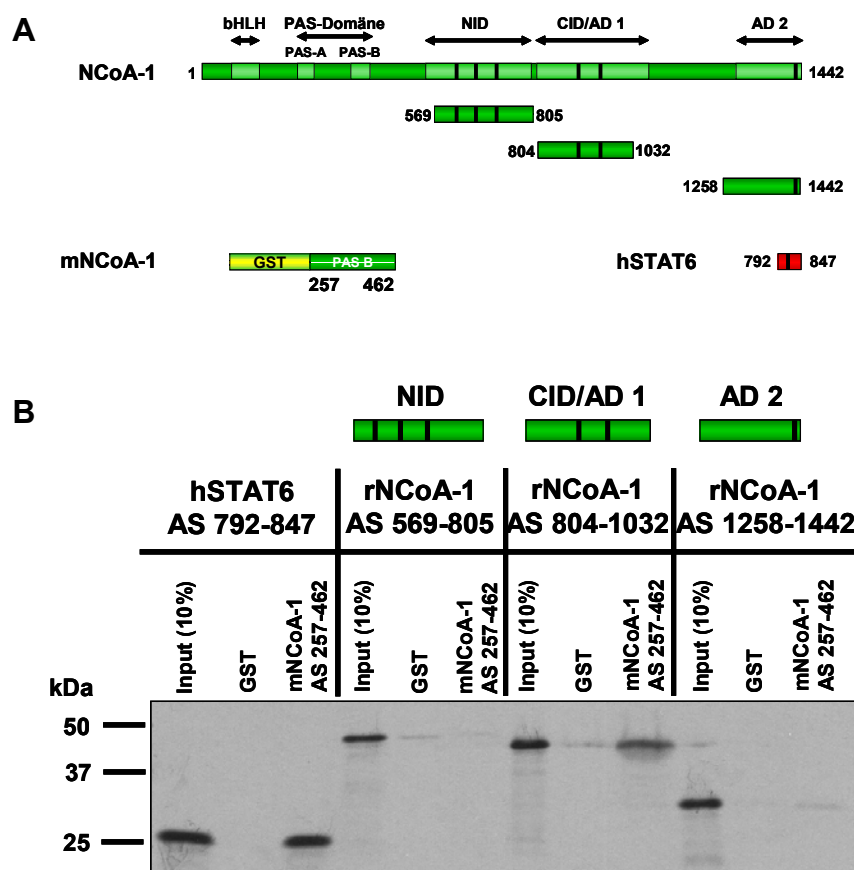


Abb. 3.4 Die PAS-B-Domäne des murinen NCoA-1 interagiert spezifisch mit einer Region in der CID/AD1 von NCoA-1 *in vitro*

(A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1, verschiedener NCoA-1-Konstrukte und eines Fragmentes der STAT6-Transaktivierungsdomäne. Die bHLH-Domäne, die PAS-Domäne, die NID, die CID/AD1 und die AD2 sind dargestellt. LXXLL-Motive sind als schwarze Balken gekennzeichnet. Das GST-Fusionsprotein der murinen (m)NCoA-1-PAS-B-Domäne umfasst die Aminosäuren 213-462. Das Fragment der humanen (h)STAT6-TAD enthält das NCoA-1-interagierende LXXLL-Motiv. (B) An Glutathion-Sepharose gebundenes GST bzw. das GST-Fusionsprotein der NCoA-1-PAS-B-Domäne wurde mit den radioaktiv-markierten NCoA-1-Fragmenten bzw. dem STAT6-Fragment inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Jeweils 10% der eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine wurden als Kontrolle zusätzlich aufgetragen (Input).

Die PAS-B-Domäne von mNCoA-1 zeigte wie erwartet und bereits publiziert (Litterst and Pfitzner, 2001 und 2002 und Razeto et al., 2004) eine deutliche Interaktion mit dem Fragment, das das LXXLL-Motiv in der STAT6-Transaktivierungsdomäne enthält, während der Kontrollansatz mit GST keinerlei Interaktion aufweist (Abb. 3.4 B). Eine spezifische Interaktion des GST-Fusionsproteines der PAS-B-Domäne mit dem Fragment, das die zwei LXXLL-Motive in der CID/AD1 von NCoA-1 umfasst (AS 804-1032) war nachweisbar. Die anderen Domänen von NCoA-1, die LXXLL-Motive enthalten, die Nuclear-Receptor-Interaction-Domäne (AS 569-805) und die Transaktivierungsdomäne AD2 (AS 1258-1442), zeigten keinerlei Interaktion mit der PAS-B-Domäne. Ebenso war eine unspezifische Interaktion der drei radioaktiv-markierten NCoA-1-Fragmente mit GST allein nicht zu beobachten. Das Ergebnis der Interaktionsuntersuchung zeigt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 *in vitro* spezifisch mit einer Region von NCoA-1 interagiert, die in der CBP-Interaktions-Domäne (CID/AD1) liegt. Dieser Bereich umfasst die Aminosäuren 804-1032 und enthält zwei LXXLL-Motive. Die anderen Regionen von NCoA-1, die LXXLL-Motive enthalten, zeigen dagegen keine Interaktion mit der PAS-B-Domäne.

3.2 Analyse der PAS-B-Domänen aller NCoA-Proteine

3.2.1 Vergleich der Interaktion der PAS-B-Domänen aller NCoA-Familienmitglieder mit allen Vollängen-Proteinen

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit allen drei Mitgliedern der NCoA-Koaktivator-Proteinfamilie interagiert. Der Bereich der bHLH/PAS-Domäne stellt zwischen den NCoA-Proteinen, die am höchsten konservierte Region mit einer Sequenzähnlichkeit von 67-73%, bzw. einer Sequenzidentität von 59-64% dar (Xu and Li, 2003). Daher stellte sich die Frage, ob die anderen beiden Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie ebenso über die PAS-B-Domäne mit NCoA-Proteinen interagieren können. Zum Vergleich der NCoA-Familienmitglieder wurden daher GST-Fusionsproteine der

PAS-B-Domänen des humanen NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 verwendet. Die Fusionsproteine umfassten dabei den Bereich von AS 260-370 von NCoA-1, AS 268-379 von NCoA-2 und AS 265-375 von NCoA-3. In GST-Interaktionsstudien erfolgte die Inkubation der GST-Fusionsproteine bzw. GST zusammen mit den [³⁵S]-markierten humanen Vollängen-Proteinen aller drei NCoA-Familienmitglieder (Abb. 3.5).

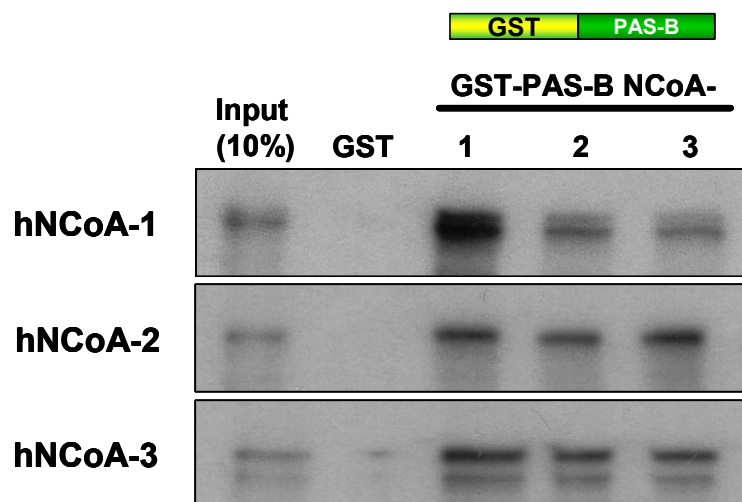


Abb. 3.5 Die PAS-B-Domäne aller NCoA-Proteine interagiert mit allen Vollängen-Proteinen der NCoA-Familie *in vitro*

GST bzw. die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen von humanem NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 wurden mit den [³⁵S]-markierten humanen Vollängen-Proteinen aller drei NCoA-Familienmitglieder inkubiert. Gebundene Proteine wurden eluiert und anschließend durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Zur Kontrolle wurden jeweils 10% der eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine auf das SDS-Gel aufgetragen (Input).

Übereinstimmend zu den Versuchen mit dem murinen NCoA-1-Fusionsprotein (siehe Abb. 3.2) erkennt man, dass alle drei PAS-B-Domänen *in vitro* mit allen Mitgliedern der NCoA-Proteinfamilie interagierten. Vergleicht man die Intensität der Banden so fällt auf, dass die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und dem Vollängen-NCoA-1 stärker ist, als die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-2 oder NCoA-3.

Dieses Experiment zeigt, dass die gefundene Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit den NCoA-Proteinen nicht ausschließlich auf NCoA-1 beschränkt ist, sondern dass die PAS-B-Domänen aller drei NCoA-Familienmitglieder mit allen NCoA-Proteinen interagieren können. Allerdings

deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die einzelnen Interaktionen unterschiedlich sind, bzw. über andere Bereiche oder Domänen vermittelt werden könnten.

3.2.2 Untersuchung der Interaktions-Spezifität der verschiedenen PAS-B-Domänen

Der Vergleich der PAS-B-Domänen von NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 hat gezeigt, dass die PAS-B-Domänen eine Interaktion mit allen drei NCoA-Proteinen vermitteln können. Dieses Ergebnis wirft jedoch die Frage auf, ob alle diese Interaktionen durch eine Bindung an die CID/AD1 vermittelt werden oder ob andere Interaktions-Motive (z.B. weitere LXXLL-Motive) oder Domänen eine Rolle spielen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte daher der gleiche Versuchsansatz wie in Abschnitt 3.1.4.

Die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen von NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 wurden dazu mit den radioaktiv-markierten Fragmenten von NCoA-1 inkubiert, die die verschiedenen Regionen repräsentieren, die LXXLL-Motive umfassen (siehe auch Abb. 3.4 A). Zusätzlich wurde außerdem das Fragment verwendet, das den Bereich von STAT6 beinhaltet (AS 792-847), der eine Interaktion mit NCoA-1 vermittelt, aber keine Interaktion mit NCoA-2 oder NCoA-3 zeigen sollte. Die GST-Fusionsproteine bzw. GST wurden zusammen mit den [³⁵S]-markierten NCoA-1-Fragmenten bzw. dem STAT6-Fragment in einer GST-Interaktionsstudie eingesetzt und anschließend analysiert (Abb. 3.6)

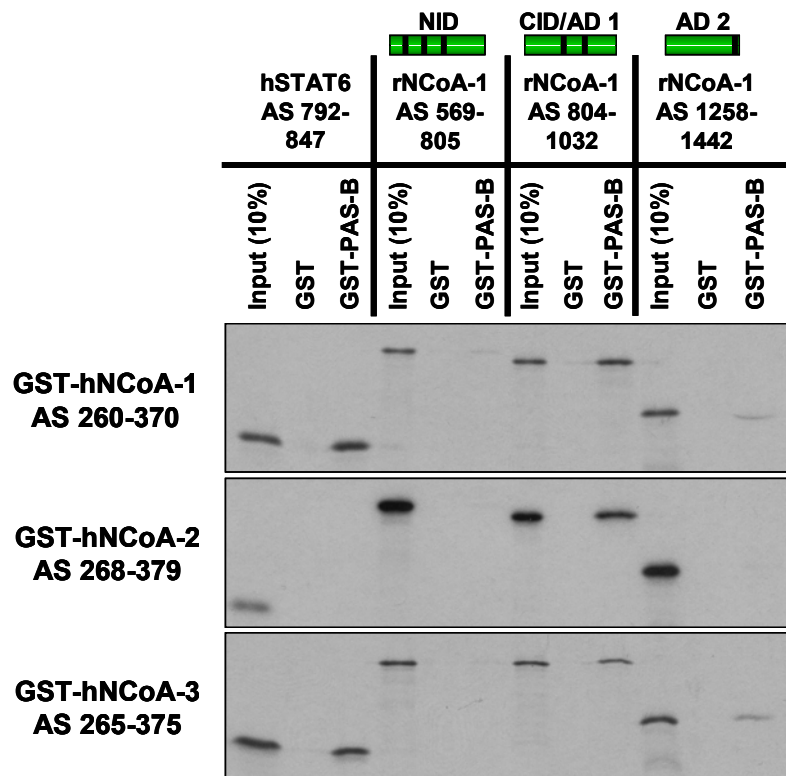


Abb. 3.6 Die PAS-B-Domäne aller NCoA-Familienmitglieder interagiert spezifisch mit der CID/AD1 von NCoA-1

[³⁵S]-Methionin-markierte Fragmente von NCoA-1, die die verschiedenen Regionen repräsentieren, die LXXLL-Motive enthalten und ein Fragment der STAT6-TAD, das das spezifisch mit NCoA-1-interagierende LXXLL-Motiv enthält, wurden mit GST oder den GST-Fusionsproteinen der PAS-B-Domänen der drei humanen NCoA-Proteine inkubiert. Spezifisch gebundene Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Jeweils 10% der eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine wurde als Kontrolle zusätzlich aufgetragen (Input).

Auch die PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 zeigen, ebenso wie das humane NCoA-1 bzw. das murine NCoA-1 (Abb. 3.4 B), eine spezifische Interaktion mit der CID/AD1 (zwei LXXLL-Motive). Die beiden anderen Domänen von NCoA-1, die Nuclear-Receptor-Interaktion-Domäne (NID; drei LXXLL-Motive), und die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne AD2 (ein LXXLL-Motiv), zeigten fast keine Interaktion (NID) bzw. nur eine sehr schwache Interaktion im Fall von NCoA-1 und NCoA-3 mit der AD2. Ein unerwartetes Ergebnis wurde mit dem STAT6-Fragment erzielt. Bislang wurde davon ausgegangen, dass nur NCoA-1, aber nicht NCoA-2 oder NCoA-3 mit STAT6 interagieren kann. Diese Annahme konnte in diesen Versuchen mit der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und NCoA-2 bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch eine

deutliche Interaktion zwischen der NCoA-3-PAS-B-Domäne und dem STAT6-Fragment.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die PAS-B-Domänen aller NCoA-Familienmitglieder spezifisch mit der CID/AD1 von NCoA-1 interagieren. Die Interaktion mit STAT6 beschränkt sich nicht nur, wie bereits in der Literatur gezeigt wurde, auf die PAS-B-Domäne von NCoA-1 (Litterst and Pfitzner, 2001 und Razeto et al., 2004), sondern betrifft auch die PAS-B-Domäne von NCoA-3.

3.3 Untersuchung der Interaktion zwischen den N-terminalen Domänen von NCoA-1

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Assoziation von NCoA-Proteinen über eine Interaktion (Dimerisierung) der N-terminalen bHLH/PAS-Domänen-Region vermittelt werden könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnten eine Interaktion über zwei unterschiedliche Domänen, die PAS-B-Domäne und die CBP-Interaktions-Domäne, zeigen. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass eine zusätzliche Interaktion von NCoA-Proteinen ebenso über die N-terminalen Domänen erfolgen kann. Um dies zu untersuchen, wurde ein Fragment in einer GST-Interaktionsstudie analysiert, das die Aminosäuren 1-370 von NCoA-1 enthält und damit alle drei N-terminalen Domänen (bHLH-Domäne, PAS-A- und PAS-B-Domänen-Region) umfasst (Abb. 3.7 A). Das Fusionsprotein wurde mit einem radioaktiv-markierten Fragment von NCoA-1 inkubiert, das die gleichen Aminosäuren beinhaltet (AS 1-370). Dessen Bindung an das Fusionsprotein wurde direkt mit der Bindung des Fragmentes der CID/AD1 (AS 804-1032) verglichen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Fluorographie.

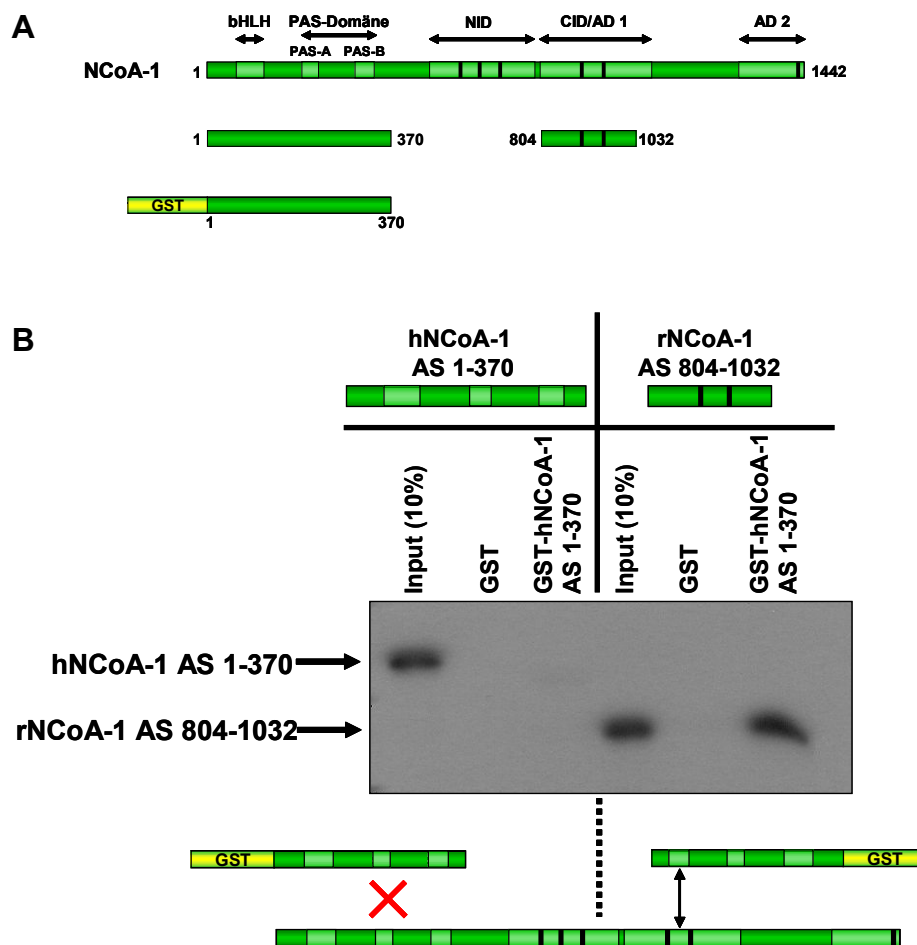


Abb. 3.7 Die Interaktion von NCoA-Proteinen wird durch die PAS-B-Domäne und die CID/AD1 vermittelt und nicht durch eine Interaktion über die aminoterminalen Domänen

(A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1 und verschiedener NCoA-1-Konstrukte. Die Region von NCoA-1, die die Aminosäuren 1-370 umfasst, beinhaltet die aminoterminalen Domänen (bHLH-Domäne, PAS-A- und PAS-B-Domäne). (B) GST oder das GST-Fusionsprotein der aminoterminalen Region von NCoA-1 wurden zusammen mit den *in vitro*-transkribierten/translatierten Fragmenten von NCoA-1 inkubiert, die die aminoterminalen Region oder die CID/AD1 (AS 804-1032) umfassen. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie. Jeweils 10%, der für die Bindungsreaktionen eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine, wurden ebenfalls auf dem SDS-Gel aufgetragen (Input).

Das GST-Fusionsprotein mit den drei N-terminalen Domänen von NCoA-1 zeigte keinerlei Interaktion mit dem *in vitro*-transkribierten/translatierten Fragment, das den gleichen Bereich mit den Aminosäuren 1-370 von NCoA-1 umfasst (Abb. 3.7 B). Der direkte Vergleich mit dem [³⁵S]-markierten Fragment, das die CID/AD1 enthält, zeigte dagegen deutlich eine starke Interaktion. Diese Interaktion ist vergleichbar mit der Interaktion des kürzeren GST-Fusionsproteins, das die PAS-B-Domäne (AS 260-370) von NCoA-1 enthält

(siehe Abb. 3.6). Dieses Resultat zeigte, dass eine Interaktion der N-terminalen Domänen von NCoA-1, die in der Literatur postuliert worden war, *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnten die Ergebnisse der vorherigen Versuche, die eine Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 zeigten, mit dem GST-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne bestätigt werden. Dieses Ergebnis legt daher einen neuen Mechanismus der Rekrutierung von Koaktivatoren nahe.

3.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CBP-Interaktions-Domäne

3.4.1 Einschränkung der Interaktionsregion in der CID/AD1

Die bisher verwendete Region, die die Interaktion mit der PAS-B-Domäne vermittelt, umfasst den Bereich der Aminosäuren 804-1032 in der CID/AD1 von NCoA-1. Diese Region enthält beide LXXLL-Motive und den vollständigen Bereich, der die Interaktion mit CBP vermittelt (AS 926-960) (Sheppard et al., 2001). Um die Größe der Interaktionsoberfläche weiter zu beschränken und zu analysieren ob die LXXLL-Motive ausreichend sind, erfolgte eine GST-Interaktionsstudie mit einem radioaktiv-markierten Fragment, das den Bereich der Aminosäuren 901-970 umfasst (Abb. 3.8 A). Zusätzlich dazu wurden zwei Fragmente untersucht, die den N-terminalen Bereich dieses Fragmentes mit den beiden LXXLL-Motiven enthalten (AS 901-937) bzw. den C-terminalen Bereich ohne LXXLL-Motive (AS 938-970). Die *in vitro*-transkribierten/translatierten und radioaktiv-markierten Fragmente wurden jeweils mit den an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteinen der PAS-B-Domänen der NCoA-Proteine inkubiert. Außerdem wurde untersucht, ob die PAS-B-Domänen der NCoA-Proteine und CBP gleiche bzw. überlappende Bindungsmotive in der CID/AD1 haben. Dazu wurde ein GST-Fusionsprotein verwendet, das die Region von CBP enthält, die für die Interaktion mit NCoA-1 verantwortlich ist (AS 2058-2130). Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

A

mCBP (AS 2058-2130)

901 QSKSEDQCISSQL**LD**ELLCPPTTVEGR**NR**DEK**AL**LEQLVSFLSGKDETELAELDRALGIDKLVQGGGLDVLS 970

901 QSKSEDQCISSQL**LD**ELLCPPTTVEGR**NR**DEK**AL**LEQLV 937

938 SFLSGKDETELAELDRALGIDKLVQGGGLDVLS 970

B

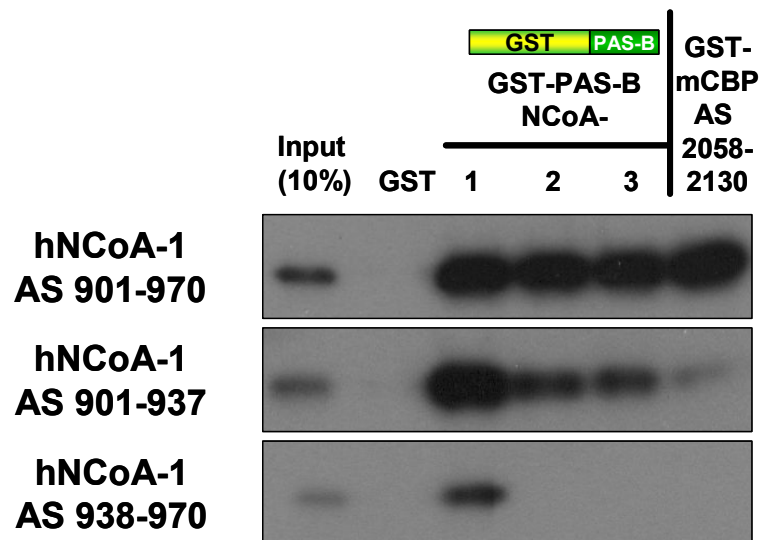


Abb. 3.8 Die Region in der CID/AD1 von NCoA-1, die die Aminosäuren 901-970 umfasst, vermittelt die Interaktion mit den PAS-B-Domänen aller NCoA-Proteine

(A) Schematische Darstellung der CID/AD1 von NCoA-1. Die Region in der CID/AD1, die die Aminosäuren 901-970 des humanen NCoA-1 umfasst, ist dargestellt. In dieser Region befinden sich beide LXXLL-Motive (rot), sowie die vollständige Region, die die Interaktion mit dem murinen (m)CBP (NCoA-1 AS 926-960, blaue Umrandung) vermittelt (Sheppard et al., 2001). Die aminoterminalen Region zwischen AS 901-937 enthält beide LXXLL-Motive, während der carboxyterminale Bereich (AS 938-970) kein LXXLL-Motiv enthält. (B) Die radioaktiv-markierten Fragmente der CID/AD1 des humanen (h)NCoA-1 (AS 901-970), sowie die aminoterminalen und carboxyterminalen Fragmente wurden mit GST oder den GST-Fusionsproteinen der PAS-B-Domänen von humanem NCoA-1, NCoA-2 oder NCoA-3 inkubiert. Zusätzlich wurde ein GST-Fusionsprotein mit einer Region von mCBP (AS 2058-2130) eingesetzt, das die Interaktion mit NCoA-1 vermittelt. Die Bindung der radioaktiv-markierten Proteine wurde durch SDS-PAGE und Fluorographie untersucht. Jeweils ein Aliquot, das 10% des eingesetzten Retikulozytenlysates entspricht, wurde gleichzeitig analysiert (Input).

Die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen aller drei NCoA-Proteine und das Fusionsprotein der NCoA-Interaktions-Domäne von CBP zeigten eine starke Interaktion mit dem eingeschränkten CID/AD1-Fragment (Abb. 3.8 B, oberste Reihe). Unterschiedliche Resultate wurden mit den beiden amino- und carboxyterminalen Fragmenten erzielt. Bei dem N-terminalen Konstrukt (AS 901-937, Abb. 3.8 B, mittlere Reihe) zeigte sich bei der PAS-B-Domäne von NCoA-1 das gleiche Ergebnis wie bei dem längeren Fragment. Im Gegensatz

dazu war die Interaktion mit den GST-Fusionsproteinen der PAS-B-Domäne von NCoA-2 und NCoA-3 deutlich herabgesetzt und die Interaktion mit dem GST-CBP-Fusionsprotein war nahezu nicht mehr vorhanden. Mit dem C-terminalen Fragment (AS 938-970, Abb. 3.8 B, unterste Reihe) wurde eine Bindung an die NCoA-1-PAS-B-Domäne beobachtet. Diese war jedoch im Vergleich zum gesamten CID/AD1-Fragment (AS 901-970) und zum aminoterminalen Bereich deutlich schwächer. Die PAS-B-Domänen von NCoA-2 oder NCoA-3 und das CBP-Fusionsprotein zeigten dagegen keine Bindung mehr.

3.4.2 Konkurrenz der Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 mit LXXLL-Peptiden

Die CID/AD1 beinhaltet in ihrer Aminosäure-Sequenz zwei LXXLL-Motive (Abb. 3.4 A). Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse war es nicht möglich zu sagen, ob beide Motive für die Interaktion notwendig sind oder ob nur eines der beiden Motive die Interaktion mit den verschiedenen PAS-B-Domänen vermittelt. Zur Analyse dieser Fragestellung wurden zwei Peptide aus dieser Region abgeleitet, die die beiden LXXLL-Motive und die jeweils benachbarten Aminosäuren aus der CID/AD1 abdecken (Abb. 3.9 A, Peptid Motiv 4 und 5). Es wurde untersucht, ob die Hemmung eines LXXLL-Motives ausreichend ist für die Hemmung der Interaktion und ob es dabei im Vergleich der verschiedenen NCoA-PAS-B-Domänen andere Bindungsmotive bzw. Affinitäten für die Interaktionen gibt. Dazu wurden die Peptide in GST-Interaktionsstudien mit einem radioaktiv-markierten Fragment der CID/AD1 (AS 804-1032 von NCoA-1) und den GST-Fusionsproteinen der NCoA-PAS-B-Domänen eingesetzt. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein Peptid eingesetzt, das das LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 repräsentiert und das in entsprechenden Konkurrenz-Versuchen die Bindung zwischen der NCoA-1-PAS-B-Domäne und der STAT6-Transaktivierungsdomäne blockierte (Litterst and Pfitzner, 2002). Die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen bzw. GST wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Anschließend erfolgte die Zugabe

des [^{35}S]-markierten, *in vitro*-translatierten Proteinens in Abwesenheit oder Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen (280 μM , 28 μM oder 2,8 μM) der verschiedenen Peptide. Die Peptide und das radioaktiv-markierte Fragment wurden dabei mindestens 15 Minuten vor Zugabe gemeinsam inkubiert. Nicht bindende Proteine wurden durch Waschen entfernt und die Ansätze mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert (Abb. 3.9 B).

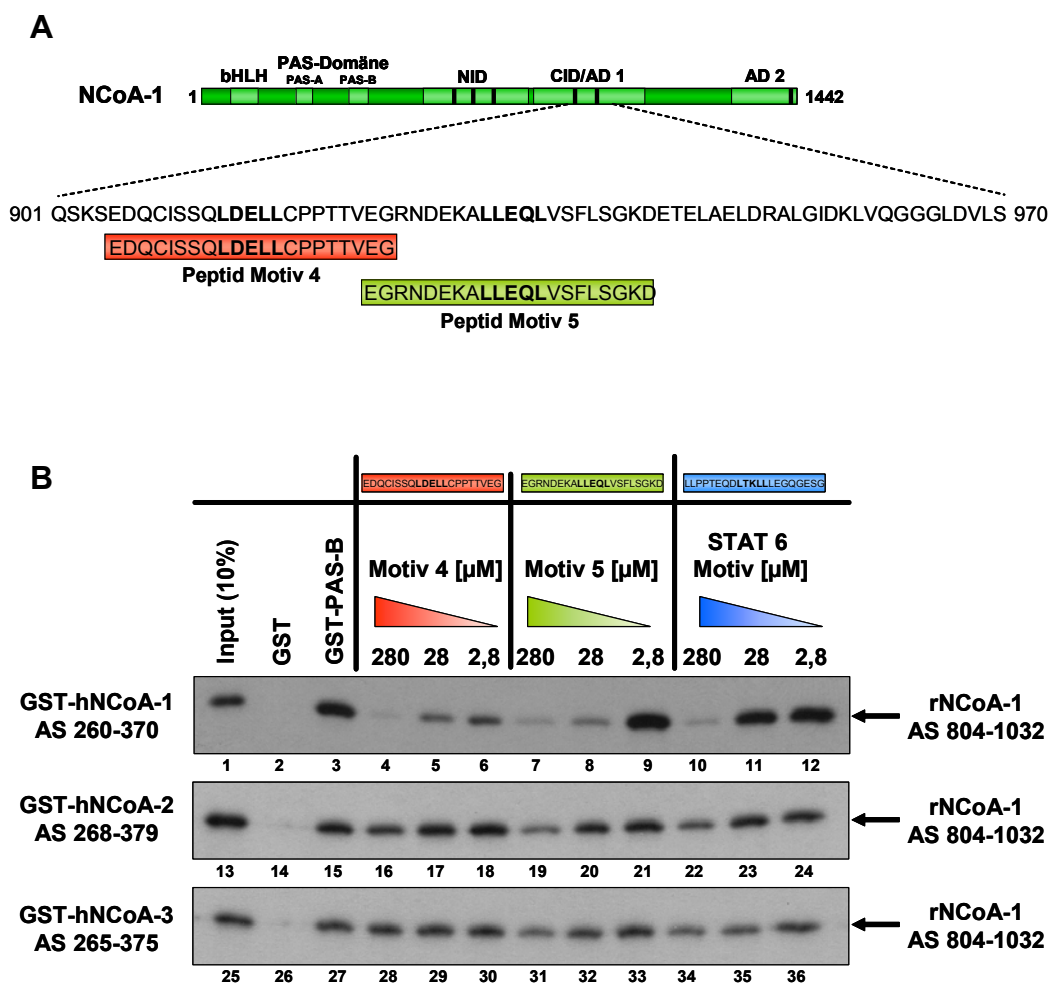


Abb. 3.9 **Kompetition der Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 durch LXXLL-Peptide**

(A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1 und der Aminosäure-Sequenz der CID/AD1-Region (AS 901-970). Die verschiedenen funktionellen Domänen und die LXXLL-Motive (schwarze Balken bzw. fett gedruckt) sind angezeigt. Die Sequenz der Peptide, die vom LXXLL-Motiv 4 (rot) und LXXLL-Motiv 5 (grün) und der jeweiligen benachbarten Aminosäuren in der CID/AD1 abgeleitet wurden, sind dargestellt. (B) GST bzw. die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen des humanen (h)NCoA-1, NCoA-2 oder NCoA-3 wurden mit einem radioaktiv-markierten Fragment der CID/AD1 des Ratten-(r)NCoA-1 (AS 804-1032) in Abwesenheit oder Anwesenheit von 280 μM , 28 μM oder 2,8 μM der entsprechenden Peptide inkubiert. Nach der Elution der gebundenen Proteine erfolgte die Analyse durch SDS-PAGE und Fluorographie (Spuren 2-12, 14-24 und 26-36). Zur Kontrolle wurde jeweils 10% des eingesetzten radioaktiv-markierten Proteinens auf das SDS-Gel aufgetragen (Input; Spuren 1, 13 und 25).

Abbildung 3.9 B zeigt den Einfluss der Peptide auf die Interaktion der PAS-B-Domänen und der CID/AD1. Das Peptid, das das LXXLL-Motiv 4 repräsentiert, blockierte die Interaktion bei der höchsten verwendeten Konzentration (280 μM , Spur 4) nahezu vollständig. Allerdings zeigte sich auch bei den niedrigeren Konzentrationen ein deutlicher kompetitiver Effekt (Spuren 5 und 6). Durch Zugabe des Peptides Motiv 5 kam es ebenso zur fast kompletten Inhibition der Interaktion bei der höchsten Konzentration (Spur 7) und einer sehr starken Inhibierung bei 28 μM (Spur 8). Dagegen konnte eine Beeinträchtigung der Interaktion bei der niedrigsten Konzentration (2,8 μM , Spur 9), im Gegensatz zu dem Peptid Motiv 4, nicht beobachtet werden. Ein teilweise abweichender Effekt wurde bei dem Peptid beobachtet, das das STAT6-LXXLL-Motiv enthält. Während die höchste Konzentration des Peptides die Interaktion praktisch komplett inhibierte (Spur 10), zeigte sich bei den niedrigeren Konzentrationen kein Einfluss auf die Bindung des CID/AD1-Fragmentes (Spuren 11 und 12). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der PAS-B-Domäne von NCoA-1, wurde die Interaktion mit der NCoA-2-PAS-B-Domäne nur leicht beeinflusst. Die Bindung der CID/AD1 wurde dabei auch bei der höchsten Konzentration fast nicht durch das Peptid inhibiert, das das LXXLL-Motiv 4 enthält (Spur 16). Ebenso inhibierte das LXXLL Motiv 5-repräsentierende Fragment bei einer Konzentration von 280 μM die Interaktion nur teilweise (Spur 19). Beide Peptide hatten bei niedrigeren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Interaktion (Spuren 17, 18 und 20, 21). Das gleiche Resultat zeigte sich bei dem STAT6-Peptid, das die Interaktion nur bei der höchsten Konzentration beeinträchtigte (Spuren 22-24). Keines der drei verwendeten Peptide zeigte ähnlich deutliche Hemmeffekte, wie bei der PAS-B-Domäne von NCoA-1 beobachtet. Im Fall der PAS-B-Domäne von NCoA-3 konnte bei keiner der verwendeten Konzentrationen des Peptides Motiv 4 ein Effekt beobachtet werden (Spuren 28-30). Eine geringe Inhibition konnte durch Zugabe des Peptides Motiv 5 erreicht werden (280 μM , Spur 31), die mit dem Effekt bei der NCoA-2-PAS-B-Domäne vergleichbar war (Spur 19). Gleichfalls wurde nur ein sehr geringer Einfluss des STAT6-Motivs auf die Interaktion beobachtet (Spuren 34-36).

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte spezifische Kompetitionen darstellen, wurde das gleiche Experiment mit Peptiden durchgeführt, die die

drei LXXLL-Motive in der Nuclear-Receptor-Interaktion-Domäne (NID) von NCoA-1 repräsentieren (Abb. 3.10 A und B).

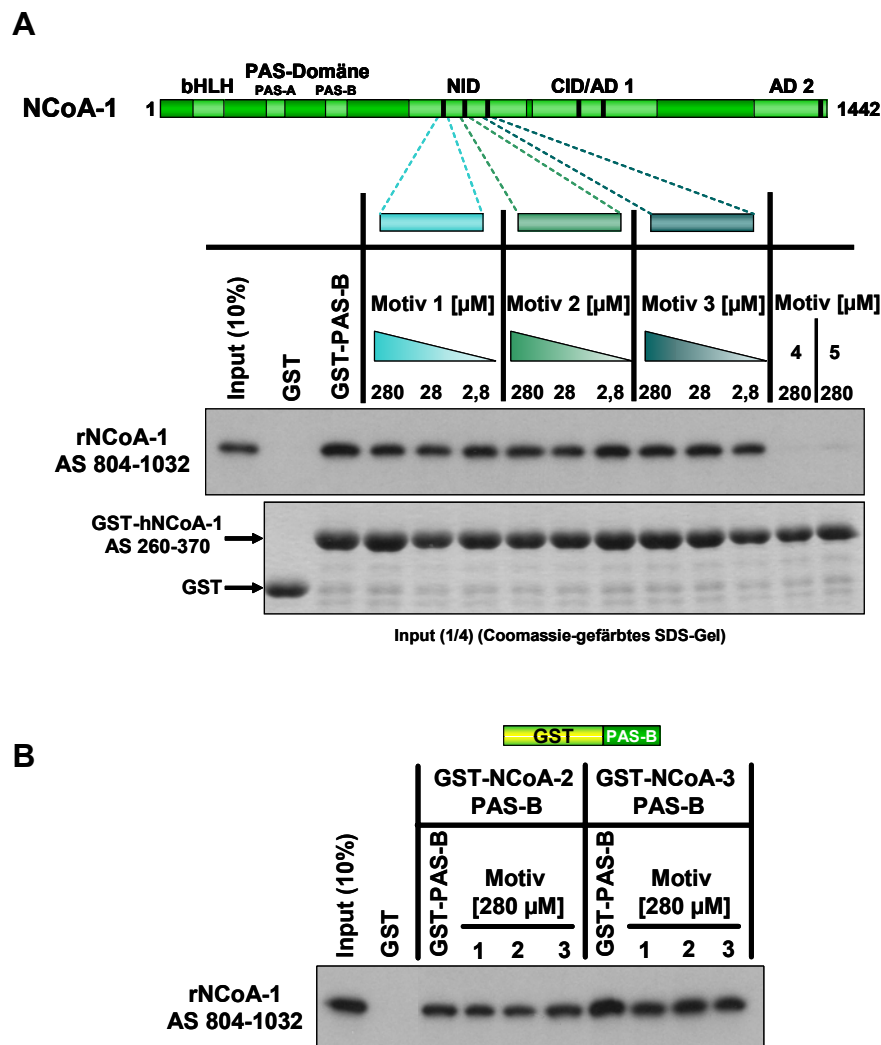


Abb. 3.10 Peptide, die die LXXLL-Motive aus der NID repräsentieren, inhibieren nicht die Interaktion zwischen den PAS-B-Domänen und der CID/AD1

(A) Das radioaktiv-markierte Fragment der CID/AD1 des Ratten-(r)NCoA-1 (AS 804-1032) wurde zusammen mit GST alleine oder dem GST-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne des humanen (h)NCoA-1 inkubiert. Die Kompetitions-Versuche erfolgten in Abwesenheit oder Anwesenheit der Peptide, die die LXXLL-Motive 1, 2 oder 3 in der NID von NCoA-1 repräsentieren, in verschiedenen Konzentrationen (280, 28 oder 2,8 μM). Zum Vergleich erfolgten zwei Kompetitions-Versuche mit jeweils 280 μM der Peptide, die die LXXLL-Motive 4 und 5 in der CID/AD1 repräsentieren. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie. 10% des eingesetzten radioaktiv-markierten Proteines wurde als Kontrolle zusätzlich aufgetragen (Input). Jeweils ein Viertel der Ansätze wurde durch SDS-PAGE und einer nachfolgenden Coomassie-Färbung des Geles analysiert, um die Mengen des gebundenen GST bzw. GST-Fusionsproteines zu überprüfen und zu vergleichen. (B) Die Kompetitions-Experimente wurden durchgeführt, wie in A beschrieben. GST alleine oder die GST-Fusionsproteine des humanen NCoA-2 und NCoA-3 wurden verwendet. Zur Untersuchung der Kompetition wurden die Peptide, die die LXXLL-Motive 1, 2 und 3 repräsentieren, in einer Konzentration von 280 μM eingesetzt.

Im Vergleich zu dem starken Kompletions-Effekt der Motive 4 und 5 (280 μM) aus der CID/AD1 (Abb. 3.10 A, rechte Seite), zeigten die Peptide Motiv 1, Motiv 2 und Motiv 3 bei keiner der verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und der CID/AD1 (Abb. 3.10 A). Das gleiche Resultat wurde bei den GST-Fusionsproteinen der PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 und den höchsten Konzentrationen jedes Peptides (280 μM) beobachtet (Abb. 3.10 B).

3.4.3 Kompetitions-Versuche mit größeren Peptiden

Die durchgeführten Kompetitions-Versuche zeigten unterschiedliche Ergebnisse mit den Peptiden, die die LXXLL-Motive in der CBP-Interaktions-Domäne darstellen. Die Interaktion der NCoA-3-PAS-B-Domäne mit der CBP-Interaktions-Domäne wurde dabei fast nicht beeinflusst. Außerdem zeigten die Versuche in Abbildung 3.8 B, dass für die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-2 und NCoA-3 auch Bereiche hinter dem LXXLL-Motiv 5 wichtig zu sein scheinen. Daher stellt sich die Frage, ob ein Peptid, das beide LXXLL-Motive und die carboxyterminale Region enthält, einen Einfluss auf diese Interaktionen haben könnte. Dies wurde in einem Kompetitions-Experiment getestet, bei dem ein Peptid eingesetzt wurde, das die Aminosäure-Sequenz 901-970 von NCoA-1 umfasste (Abb. 3.11 A). Dazu wurde das NCoA-1 Fragment AS 901-970 als GST-Fusionsprotein aus dem pGEX-2-TEV-Vektor in *E.coli* hergestellt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung und die Abspaltung der Glutathion-S-Transferase durch die TEV-Protease (siehe Abschnitt 2.2.3.12). Nach Entfernung des GST und der TEV-Protease, erfolgte die Dialyse gegen TIF-Puffer. Das gereinigte hNCoA-1 AS 901-970 wurde dann mit einer Konzentration von 30 μM eingesetzt. Die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen oder GST alleine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und anschließend mit dem radioaktiv-markierten Fragment der CID/AD1 (AS 804-1032) inkubiert. Wie bereits in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, erfolgte die Inkubation des gereinigten Peptides und des *in vitro*-translatierten Proteines für mindestens 15 Minuten vor Zugabe zu den GST-Fusionsproteinen. Die Analyse

erfolgte nach mehreren Waschschrritten durch SDS-PAGE und Fluorographie (Abb. 3.11 B).

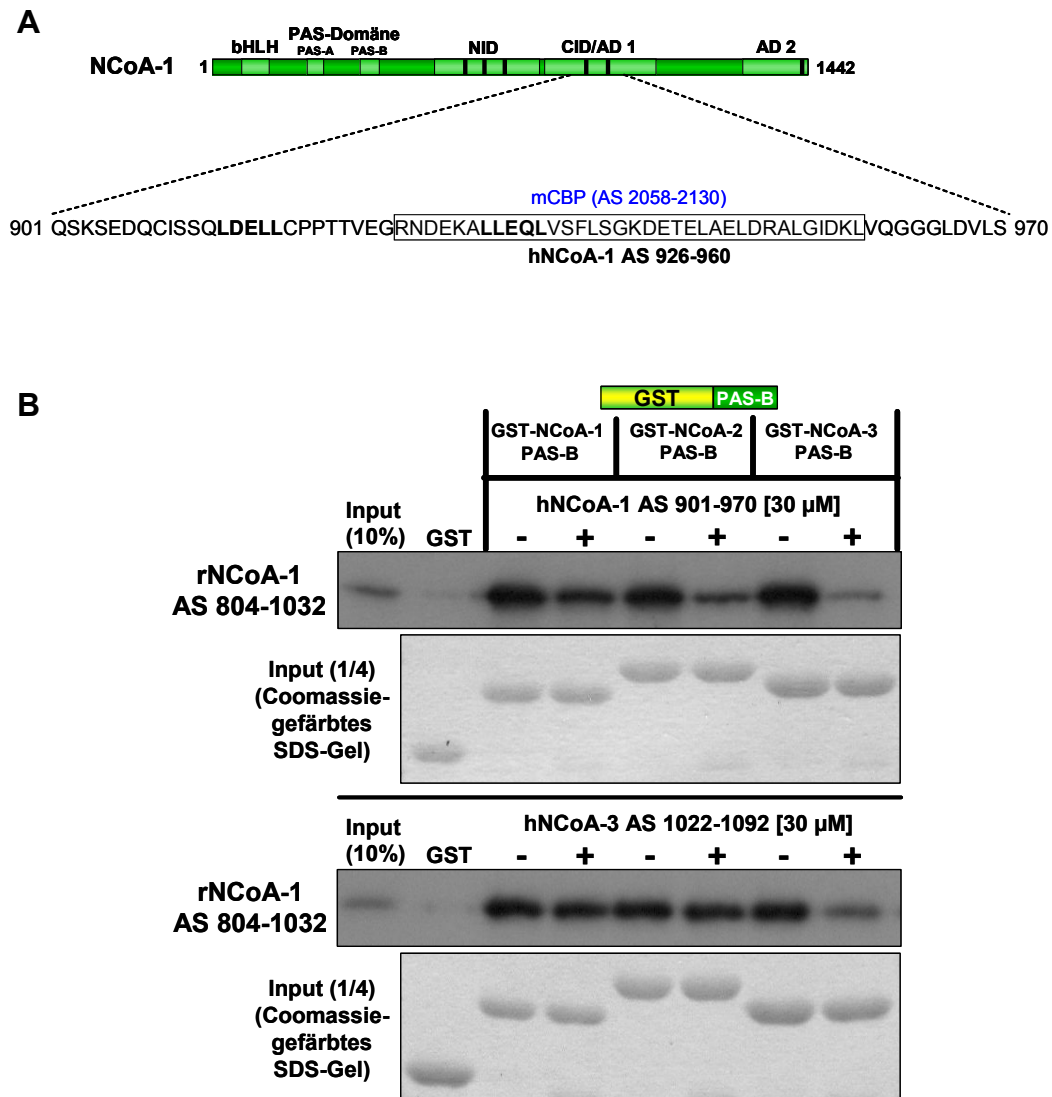


Abb. 3.11 Carboxyterminale Aminosäuren in der CID/AD1 sind wichtig für die Interaktion mit der NCoA-3-PAS-B-Domäne

(A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1 und der Region, die die Aminosäuren 901-970 in der CID/AD1 des humanen NCoA-1 umfasst. Die funktionellen Domänen und LXXLL-Motive (schwarze Balken bzw. fett gedruckt) sind dargestellt. Die Region, die die Interaktion mit dem murinen (m)CBP (AS 2058-2130) vermittelt, ist umrandet. (B) Für die Kompetitions-Experimente mit Peptiden, die die CID/AD1 des humanen (h)NCoA-1 (AS 901-970) und (h)NCoA-3 (AS 1022-1092) umfassen, erfolgte die Expression der Peptide als GST-Fusionsproteine in *E. coli* und die Aufreinigung mit Hilfe von Glutathion-Sepharose. Nach der Entfernung des GST-Anteils durch die TEV-Protease, wurden die Peptide in den Kompetitions-Versuchen eingesetzt. GST oder die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen des humanen NCoA-1, NCoA-2 oder NCoA-3 wurden mit dem radioaktiv-markierten Fragment der CID/AD1 des Ratten-(r)NCoA-1 (AS 804-1032), zusammen mit oder ohne die angegebenen Peptide (30 µM), inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Jeweils 10% des eingesetzten radioaktiv-markierten Proteinens wurde zur Kontrolle auf das SDS-Gel aufgetragen (Input). Zur Überprüfung der Menge des gebundenen GST bzw. der GST-Fusionsproteine wurden jeweils ein Viertel der Ansätze durch SDS-PAGE und eine Coomassie-Färbung analysiert.

Die Bindung der PAS-B-Domäne von NCoA-1 an die CID/AD1 wurde durch das Peptid (AS 901-970) mit beiden LXXLL-Motiven und den carboxyterminalen Aminosäuren in einem ähnlich starken Ausmaß beeinträchtigt, wie durch die Peptide mit den einzelnen LXXLL-Motiven bei entsprechender Konzentration (28 μ M; siehe dazu Abb. 3.9 B). Ein etwas stärkerer Effekt konnte bei der PAS-B-Domäne von NCoA-2 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch ein überraschendes Ergebnis bei der NCoA-3-PAS-B-Domäne. Das Peptid, das die Aminosäuren 901-970 von NCoA-1 umfasst, inhibierte fast vollständig die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-3 und der NCoA-1-CBP-Interaktions-Domäne (Abb. 3.11 B, rechte Seite). Zusammen mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.4.1 bestätigte dieses Ergebnis die Vermutung, dass für die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-3 und der CID/AD1 von NCoA-1 Bereiche in der carboxyterminalen Region wichtig sind.

Um zu vergleichen, ob die Interaktionsmotive von NCoA-1 und NCoA-3 in der CID/AD1 gleichwertig sind oder ob es einen Unterschied bei der Interaktion mit den verschiedenen PAS-B-Domänen gibt, erfolgte der gleiche Versuch mit einem gereinigten Fragment von NCoA-3 AS 1022-1092. Dieser Bereich entspricht der Region der CID/AD1 von NCoA-1 AS 901-970. Es zeigte sich, dass das Peptid mit den Aminosäuren 1022-1092 von hNCoA-3 keinen Effekt auf die Interaktion der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-2 hatte (Abb. 3.11 B, untere Reihen). Die Interaktion mit der NCoA-3-PAS-B-Domäne wurde fast vollständig gehemmt und zeigte damit einen annähernd gleichen Effekt, wie bei Verwendung des aus NCoA-1-abgeleiteten Fragmentes mit den Aminosäuren 901-970.

3.4.4 Vergleich der CID/AD1 von NCoA-1 und NCoA-3

Die vorhergehenden Experimente verdeutlichen, dass bei den nachgewiesenen Interaktionen zwischen den PAS-B-Domänen der verschiedenen NCoA-Proteine und der CID/AD1 von NCoA-1 unterschiedliche Interaktionsmotive verwendet werden. Zur weiteren Untersuchung der Unterschiede zwischen NCoA-1 und NCoA-3 wurde der Versuchsansatz aus Abschnitt 3.4.1 mit einem

in vitro-transkribierten/translatierten und radioaktiv-markierten Fragment aus der CID/AD1 von NCoA-3 (AS 1022-1092) wiederholt. Ebenso wie der Bereich der entsprechenden Region aus NCoA-1 (AS 901-970) enthält diese Region beide LXXLL-Motive und den vollständigen Bereich, der für die Interaktion mit CBP notwendig ist (Demarest et al., 2002). Zusätzlich weist diese Region hinter dem Bereich des LXXLL-Motives 5 (LLDQL) ein weiteres LXXLL-Motiv auf (Abb. 3.12 A). Die GST-Fusionsproteine der PAS-B-Domänen aller drei NCoA-Proteine und ein GST-Fusionsprotein von CBP mit der NCoA-interagierenden Region (AS 2058-2130) wurden an Glutathion-Sepharose gebunden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem *in vitro*-translatierten Protein. Die Analyse der Interaktionsstudie erfolgte auf einem SDS-Gel und nachfolgender Fluorographie (Abb. 3.12 B).

A

hNCoA-1	mCBP (AS 2058-2130)
901 QSKSE Q DCISSQ LDELL CPPTTVEG RNDEKALLLEQL VSFLSGKDETELAELDRALGIDKLVQGGGLDVLS	970
<hr/>	
hNCoA-3	mCBP (AS 2059-2117)
1022 HGTQNRPLLRNS LDDL VGPPSNL EGQSDERALLDQLHTLL SNTDATGLEEIDRALGIPELVNQQQALEPKQ	1092

B

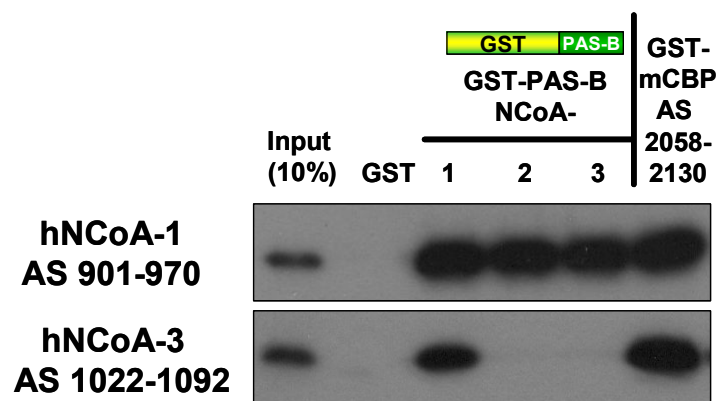


Abb. 3.12 Die PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 interagieren mit der CID/AD1 von NCoA-1, aber nicht mit der entsprechenden Region von NCoA-3

(A) Vergleich der Sequenzen der CID/AD1 des humanen (h)NCoA-1 (AS 901-970) mit der entsprechenden Region von hNCoA-3 (AS 1022-1092). Die jeweiligen LXXLL-Motive (rot) und die Regionen, die für die Interaktion mit den entsprechenden Regionen des murinen (m)CBP notwendig sind (blaue Umrandung) (Sheppard et al., 2001 und Demarest et al., 2002) sind dargestellt. (B) Bakteriell exprimiertes GST, die GST-Fusionsproteine der drei humanen NCoA-Proteine oder ein GST-Fusionsprotein des murinen (m)CBP (AS 2058-2130) wurden mit den *in vitro*-transkribierten/translatierten CID/AD1-Fragmenten von NCoA-1 oder NCoA-3 inkubiert. Die Analyse der gebundenen radioaktiv-markierten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Fluorographie. Ein Aliquot, das 10% der eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine entspricht, wurde parallel dazu analysiert (Input).

Im Gegensatz zu dem CID/AD1-Fragment von NCoA-1 (AS 901-970), erkennt man, dass nur das GST-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und das CBP-Konstrukt eine starke Bindung an das CID/AD1-Fragment von NCoA-3 aufwies. Die Fusionsproteine der PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 zeigten keinerlei Interaktion (Abb. 3.12 B, mitte).

3.4.5 Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Bestimmung der Affinität, die die PAS-B-Domäne von NCoA-1 (AS 257-370) zum LXXLL-Motiv in der STAT6-Transaktivierungsdomäne (AS 794-814) hat, ergab eine Affinitätskonstante (K_D) von 0,8 μM (Razeto et al., 2004). Um die Intensität dieser Interaktion mit der Interaktion der CID/AD1 zu den PAS-B-Domänen und zu CBP zu vergleichen und dadurch Aussagen über die bevorzugte Bindung eines spezifischen Bindungspartners treffen zu können, wurde das BIACORE-System (BIACORE-X) eingesetzt. Die Interaktionsstudien erfolgten mit einem CM5-Sensorchip. Auf die Oberflächen der beiden Flusszellen wurde zunächst ein Anti-GST-Antikörper als Fängermolekül in beiden Flusszellen immobilisiert. Für die Interaktionsmessungen wurde als Ligand das GST-Fusionsprotein der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 901-970) und als Analyt die PAS-B-Domäne von NCoA-3 (AS 262-373) eingesetzt. Als Laufpuffer wurde dabei der SB+P20-Puffer verwendet. Zunächst erfolgte die Injektion des Liganden (5 $\mu\text{g/ml}$) in Flusszelle 2 (Fc2) (Abb. 3.13 A). Anschließend erfolgte die Injektion von hNCoA-3 AS 262-373 (1 μM , 60 μl) in beide Flusszellen (Fc1 und Fc2) (Abb. 3.13 B).

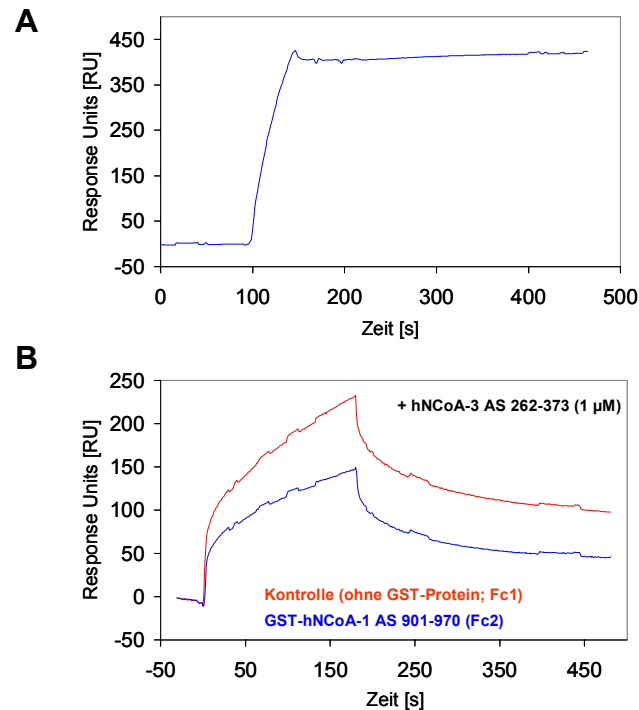


Abb. 3.13 Die unspezifische Bindung verschiedener Analyten verhindert die Bestimmung der Affinitätskonstanten

(A) Nach der Immobilisierung des GST-Antikörpers in beiden Flusszellen, erfolgte die Injektion des Liganden in Flusszelle 2 (Fc2). Als Ligand wurde das GST-Fusionsprotein der CID/AD1 des humanen NCoA-1 (AS 901-970) eingesetzt. Als Laufpuffer wurde SB+P20-Puffer verwendet. Das Sensorgramm zeigt die Bindung des Liganden (GST-hNCoA-1 AS 901-970; 4 μ l von 5 μ g/ml in SB+P20-Puffer bei einer Flussrate von 5 μ l/min) in Fc2. In Flusszelle 1 wurde kein GST-Fusionsprotein injiziert. (B) Nach der Bindung des Liganden erfolgte die Injektion des Analyten. Als Analyt wurde ein Fragment der PAS-B-Domäne des humanen (h)NCoA-3 (AS 262-373) eingesetzt. Die Injektion des Analyten (1 μ M, 60 μ l in SB+P20-Puffer) erfolgte in beide Flusszellen bei einer Flussrate von 20 μ l/min. Das Sensorgramm zeigt die Bindung des Analyten in Flusszelle 1 (Fc1, rot), in der zuvor kein GST-Fusionsprotein immobilisiert wurde und in Flusszelle 2 (Fc2, blau), in der GST-hNCoA-1 AS 901-970 immobilisiert wurde.

Die erhaltenen Sensorgramme zeigen, dass die Immobilisierung des GST-Fusionsproteines der CID/AD1 von NCoA-1 in der Flusszelle 2 auf dem CM5-Sensorchip erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 3.13 A). Die Injektion des Bindungspartners führte jedoch in der Kontroll-Flusszelle (Fc1), im Vergleich zu der Flusszelle mit dem immobilisierten GST-hNCoA-1 AS 901-970 (Fc2), bei einigen Messungen zu einer stärkeren (Abb. 3.13 B) oder gleich starken unspezifischen Bindung (nicht gezeigt) der PAS-B-Domäne von NCoA-3. Die Kontroll-Flusszelle zeigt dabei höhere RU-Werte, als bei einer gesättigten spezifischen Bindung des Analyten ($R_{\max} = 165$) möglich gewesen wäre. Dies deutet auf eine starke unspezifische Bindung oder eine Ausfällung des Analyten über der Oberfläche des Sensorchips hin. Auch bei der Verwendung von TIF-

Puffer als Laufpuffer und eines anderen Analyten (hNCoA-1 AS 1-370), sowie bei der Kombination weiterer Liganden (GST-hNCoA-1 AS 260-370) und Analyten (7xHis-hNCoA-1 AS 901-970 oder hNCoA-1 AS 901-970) zeigte sich eine deutliche unspezifische Bindung (nicht gezeigt). Ebenso führte die direkte Immobilisierung von GST-hNCoA-1 AS 260-370 auf einem CM5-Sensorchip über die primären Amingruppen, ohne die Immobilisierung eines Anti-GST-Antikörpers, zu einer ungenügenden Interaktion mit dem Analyten (7xHis-hNCoA-1 AS 901-970) und zu einem deutlichen unspezifischen Bindungseffekt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte keine Auswertung der Sensorgramme, sowie die Bestimmung der Affinitätskonstanten bzw. deren Vergleich, erfolgen.

3.5 Physiologische Bedeutung der identifizierten Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1

3.5.1 Effekt der Überexpression der PAS-B-Domäne auf die Interaktion von NCoA-1 und CBP

Alle Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie können mit den Koaktivatoren p300 und CBP über die CID/AD1 interagieren (Yao et al., 1996; Chen et al., 1997; Torchia et al., 1997 und Kalkhoven et al., 1998). Diese Interaktion wird dabei über die LXXLL-Motive in der CID/AD1 vermittelt. Daher wurde überprüft, ob die Interaktion der PAS-B-Domäne mit der CID/AD1 Einfluss auf die Bindung von CBP haben kann. Dies könnte eine Rolle spielen, wenn z.B. unter pathologischen Bedingungen NCoA-Proteine überexprimiert werden. Um eine mögliche Verdrängung zu überprüfen, wurde ein Koimmunopräzipitations-Versuch durchgeführt. 293T-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor eines FLAG-markierten Fusionsproteines transfiziert, das die Region aus CBP enthält, die für die Interaktion mit NCoA-1 verantwortlich ist (AS 2058-2130) (Sheppard et al., 2001) oder mit dem Leervektor (pMX-FLAG). Zusätzlich dazu erfolgte die Transfektion mit dem Expressionsvektor eines Fragmentes der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 804-1032), zusammen mit der 30-fachen Menge

eines Plasmides, das für ein YFP-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (AS 213-462) oder CFP alleine kodiert (jeweils 3 µg pro Ansatz). Die Transfektion mit dem CFP-Plasmid diente dabei als Kontrolle, um zu zeigen, dass die Überexpression eines beliebigen Proteines keinen Einfluss auf die Interaktion hat. Die Gesamtzellextrakte wurden nachfolgend hergestellt und die Immunopräzipitation mit dem „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“ durchgeführt, das die FLAG-Markierung erkennt. Die Auswertung des Versuches wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese und einer anschließenden Western-Blot-Analyse mit einem Anti-Myc-Antikörper durchgeführt, der gegen das Myc-markierte CID/AD1-Fragment gerichtet ist (Abb. 3.14). Zur Kontrolle der Transfektion wurde von jedem Ansatz 1% des eingesetzten Zellextraktes vor der Immunopräzipitation entnommen und auf das SDS-Gel aufgetragen.

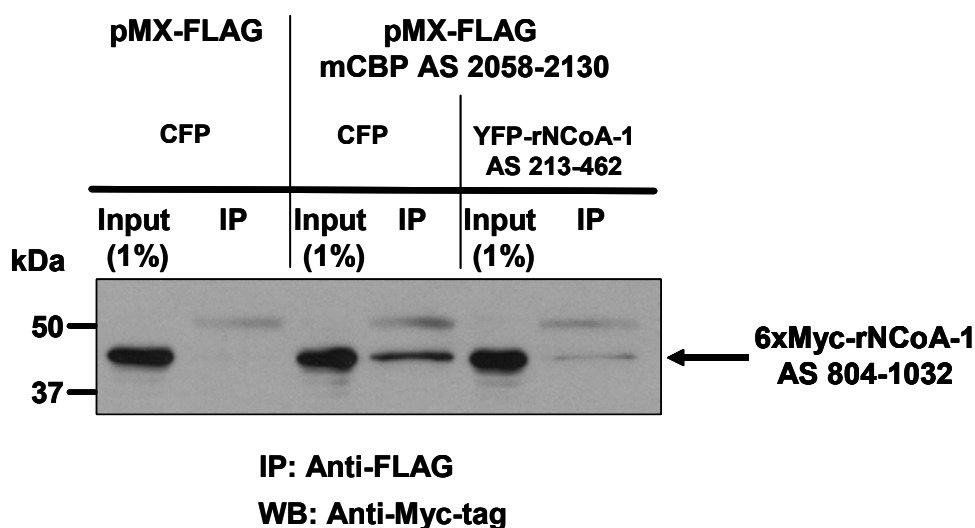


Abb. 3.14 Die Überexpression der PAS-B-Domäne hemmt die Interaktion zwischen der CID/AD1 und CBP

293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für ein FLAG-markiertes Fusionsprotein des murinen (m)CBP (AS 2058-2130) oder dem Leervektor (pMX-FLAG) (jeweils 1 µg), ein 6x Myc-markiertes Fragment der CID/AD1 des Ratten-(r)NCoA-1 (AS 804-1032) (0,1 µg), sowie einem Expressionsvektor für ein YFP-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne des Ratten-(r)NCoA-1 (AS 213-462) oder CFP alleine (jeweils 3 µg) transfiziert. Nach der Präparation der Gesamtzellextrakte erfolgte die Immunopräzipitation (IP) mit dem „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“, das die FLAG-Markierung erkennt. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE und einem nachfolgenden Western-Blot (WB) mit einem Anti-Myc-Antikörper analysiert. Zur Kontrolle wurde jeweils 1% der Zellextrakte auf das SDS-Gel aufgetragen (Input).

Das CID/AD1-Fragment von NCoA-1 konnte nur mit dem FLAG-markierten CBP-Fragment kopräzipitiert werden, das die NCoA-Interaktionsregion umfasst. Es erfolgte keine Koimmunopräzipitation bei dem Ansatz, bei dem eine Transfektion mit dem pMX-FLAG-Leervektor durchgeführt wurde. Die Überexpression des YFP-Fusionsproteines der NCoA-1-PAS-B-Domäne führte zu einer fast vollständigen Inhibition der Interaktion zwischen der CID/AD1 und des CBP-Fragmentes. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von CFP keinen Einfluss auf die Interaktion. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass die Überexpression der PAS-B-Domäne, die Interaktion zwischen der CID/AD1 und CBP hemmen kann.

3.5.2 Einfluss der CID1/AD1 auf die Bindung der NCoA-1-PAS-B-Domäne an den Transkriptionsfaktor STAT6

Frühere Studien haben gezeigt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1, die Interaktion mit einem LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 vermittelt (Litterst and Pfizner, 2001 und 2002). Daher stellt sich wie bei der Interaktion von NCoA-1 und CBP die Frage, ob die Interaktion zwischen der CID/AD1 und der PAS-B-Domäne Einfluss auf diese Interaktion haben kann. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Kompetitions-Versuch durchgeführt. Dazu wurde das GST-Fusionsprotein der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (AS 260-370) oder GST verwendet und mit dem radioaktiv-markierten Fragment der STAT6-Transaktivierungsdomäne (AS 792-847) inkubiert. Zur Konkurrenz wurden für mindestens 15 Minuten vor Zugabe des *in vitro*-translatierten Proteines, das radioaktiv-markierte Fragment mit oder ohne Peptid der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 901-970), in einer Konzentration von 45 μ M, zusammengegeben (siehe auch Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3). Die Auswertung erfolgte nach einer SDS-Gelelektrophorese durch Fluorographie und einer Quantifizierung der Radioaktivität (Abb. 3.15 A und B).

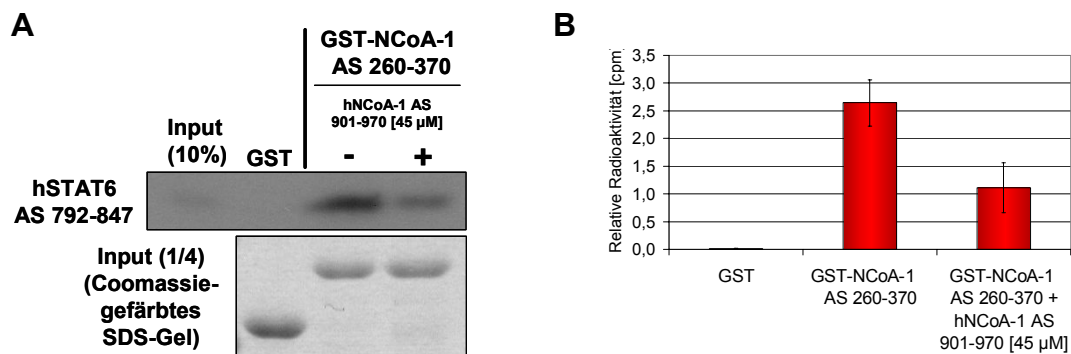


Abb. 3.15 Die CID/AD1 inhibiert die Bindung der NCoA-1-PAS-B-Domäne an die Transaktivierungsdomäne von STAT6

(A) GST oder das GST-Fusionsprotein der humanen NCoA-1-PAS-B-Domäne (AS 260-370) wurde mit dem radioaktiv-markierten Fragment der Transaktivierungsdomäne des humanen (h)STAT6 (AS 792-847) inkubiert. Die Bindungsreaktion erfolgte in Abwesenheit oder Anwesenheit eines gereinigten Peptides der CID/AD1 des humanen (h)NCoA-1 (AS 901-970) in einer Konzentration von 45 µM. Die Auswertung der Kompetitions-Experimente erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie. 10% des eingesetzten *in vitro*-translatierten Proteinens wurde zur Kontrolle gleichzeitig auf dem SDS-Gel analysiert (Input). Zur Abschätzung und zum Vergleich des gebundenen GST bzw. GST-Fusionsproteinens wurde jeweils ein Viertel der Interaktionsansätze durch SDS-PAGE und eine nachfolgende Coomassie-Färbung überprüft. (B) Quantifizierung des gebundenen radioaktiv-markierten Fragmentes der STAT6-Transaktivierungsdomäne an GST oder das GST-Fusionsprotein der NCoA-1-PAS-B-Domäne in Abwesenheit oder Anwesenheit des CID/AD1-Peptides. Die relative Radioaktivität (cpm: counts per minute) wurde durch Normalisierung gegen 10% des eingesetzten *in vitro*-translatierten Proteinens bestimmt. Der Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung ist dargestellt.

Wie in den vorherigen Versuchen bereits gezeigt (Abb. 3.6), interagiert die NCoA-1-PAS-B-Domäne mit dem Fragment der STAT6-Transaktivierungsdomäne. Die Zugabe des CID/AD1-Peptides führte zu einer deutlichen Inhibition dieser Interaktion. Die Quantifizierung zeigt dabei, dass das Peptid die Interaktion auf weniger als die Hälfte reduzierte (Abb. 3.15 B). Damit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 nicht nur die Bindung des Koaktivators CBP, sondern auch die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT6 an NCoA-1 beeinflussen kann.

3.5.3 Effekt der Überexpression von PAS-B-Domänen und der CID/AD1 auf die Transkriptionsaktivierung von nukleären Hormonrezeptoren

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt wurde, kann die Überexpression der PAS-B-Domäne oder der CID/AD1 die Interaktion von NCoA-1 mit anderen Proteinen beeinflussen (Abb. 3.14 und 3.15). Daher stellte sich die Frage, welche Rolle die Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 bei der Bildung von Koaktivator-Komplexen spielt. Dies gilt besonders für die postulierte Rekrutierung von Paaren von NCoA-Proteinen zu spezifischen Promotoren von Zielgenen nukleärer Hormonrezeptoren, bei der die N-terminalen Domänen an der Dimerisierung beteiligt sein sollen (Zhang et al., 2004b). Um den Einfluss dieser Interaktion auf die Expression der Zielgene zu untersuchen, erfolgte daher zunächst die Überexpression von Fragmenten der PAS-B-Domäne oder der CID/AD1 in Reporter-Experimenten. HeLa TA-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für den Östrogen-Rezeptor (ER), einem Luziferase-Reporter-Konstrukt mit einer ER-Bindestelle (ERE; „Estrogen responsive element“), und einem *LacZ*-Expressionsplasmid, zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, in Doppelansätzen transient transfiziert. Zusätzlich dazu erfolgte die Kotransfektion mit jeweils unterschiedlichen Mengen von Expressionsvektoren für die PAS-B-Domänen von NCoA-1 (AS 260-370), NCoA-3 (AS 265-375) und einem Fragment der NCoA-1-CID/AD1 (AS 804-1032) (Abb. 3.16 A). Die Zellen wurden für mindestens drei Tage in phenolrotfreiem Medium mit hormonfreiem FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 17β -Östradiol (E_2 ; 10^{-7} M) und die Inkubation für 16 Stunden. Die Kontrollansätze wurden nicht mit dem Hormon stimuliert, sondern in der entsprechenden Verdünnung mit Ethanol, dem Lösungsmittel des 17β -Östradiols, behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte präpariert und die Luziferase-Aktivität bestimmt (Abb. 3.16 B).

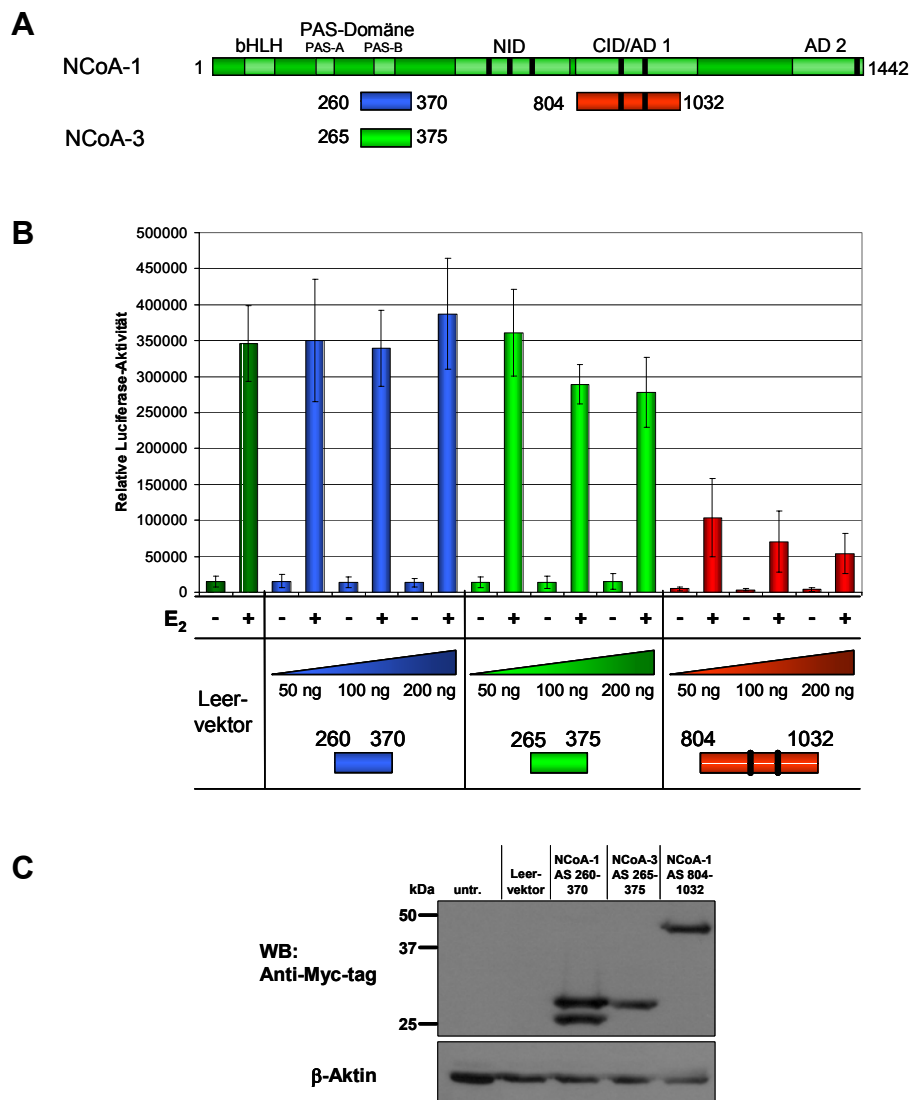


Abb. 3.16 Die Überexpression der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 zeigen unterschiedliche Effekte auf die Östrogen-Rezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung

(A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1 und verschiedenen NCoA-Proteinfragmenten (PAS-B-Domäne von NCoA-1 (grün) und NCoA-3 (blau) und die CID/AD1 von NCoA-1 (rot)). Die unterschiedlichen funktionellen Domänen und LXXLL-Motive (schwarze Balken) sind dargestellt. (B) HeLa TA-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für den Östrogen-Rezeptor (12,5 ng), einem Luciferase-Reporter-Konstrukt (pGL2-ERE TK-luc; 1,25 µg), einem *LacZ*-Expressionsplasmid (12,5 ng) und Expressionsplasmiden der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (AS 260-370), NCoA-3 (AS 265-375), der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 804-1032) (jeweils 50, 100 oder 200 ng) oder dem Leervektor (200 ng) transfiziert. Die Gesamtmenge der DNA wurde jeweils durch Zugabe des Leervektors angeglichen. Die Zellen wurden für mindestens drei Tage in phenolrotfreiem Medium mit hormonfreiem FCS inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 17β -Östradiol (E₂; 10^{-7} M) oder Ethanol, in einer entsprechenden Verdünnung, und die Inkubation für 16 Stunden. Nach Präparation der Zellextrakte erfolgte die Bestimmung der Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität. Die Luciferase-Aktivitäten wurden mit Hilfe der β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Der Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung ist gezeigt. (C) Zur Kontrolle der gleich starken Expression der NCoA-Proteinfragmente erfolgte die transiente Transfektion von jeweils 200.000 HeLa TA-Zellen in 6-Loch-Zellkulturschalen mit je 1 µg der entsprechenden Expressionsvektoren. Die Analyse der Zellextrakte (je 50 µg) erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot (WB) mit einem Anti-Myc-Antikörper, der die verwendeten Proteinfragmente detektieren kann. Zur Kontrolle erfolgte parallel die Analyse untransfizierter Zellen (untr.).

Die Überexpression der NCoA-1-PAS-B-Domäne zeigte, auch bei steigenden Mengen, keinen Effekt auf die durch den Östrogen-Rezeptor-vermittelte transkriptionelle Aktivierung im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen. Ein geringer Effekt wurde mit dem Fragment der PAS-B-Domäne von NCoA-3 beobachtet, das bei zunehmender Menge zu einer leicht verminderten Transaktivierung führte. Ein sehr deutlicher Effekt wurde mit dem Fragment der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 804-1032) erreicht. Die Überexpression der CID/AD1 reduzierte die Luziferase-Aktivität, selbst bei der geringsten Menge (50 ng), auf weniger als ein Drittel, im Vergleich zu den mit dem Leervektor-transfizierten Zellen. Um die Menge der überexprimierten Fragmente in HeLa TA-Zellextrakten zu überprüfen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-Myc-Antikörper durchgeführt, der die drei eingesetzten und Myc-markierten Fragmente detektieren kann (Abb. 3.16 C). Die drei Fragmente wurden in vergleichbaren Mengen exprimiert, so dass die unterschiedlichen Effekte nicht auf unterschiedliche Expressionsstärken zurückgeführt werden können. Die Luziferase-Reporter-Gen-Versuche zeigten somit durch die Überexpression der PAS-B-Domäne bzw. der CID/AD1 keine eindeutigen Ergebnisse, die auf eine Inhibition der Rekrutierung zweier NCoA-Proteine hinweisen würden.

3.5.4 Einfluss der NCoA-1- und NCoA-3-PAS-B-Domäne auf die Androgen-Rezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung in LnCap-Zellen

3.5.4.1 Überexpression der NCoA-1- und NCoA-3-PAS-B-Domänen in LnCap-Zellen

Es wurde postuliert, dass die Rekrutierung zweier NCoA-Proteine durch nukleäre Hormonrezeptoren nur auf bestimmten Promotoren spezifischer Zielgene stattfindet (Zhang et al., 2004b). Die bei den Reporter-Gen-Experimenten erzielten Ergebnisse (Abb. 3.16 B), die nur eine sehr geringfügige oder keine Auswirkung der Überexpression der PAS-B-Domänen gezeigt haben, könnten das Resultat dieser differentiellen Rekrutierung sein. Das Luziferase-Reporter-Gen-Konstrukt könnte unter den gewählten

Bedingungen ein zu künstliches System sein, zu dem andere Koaktivator-Komplexe rekrutiert werden. Aus diesem Grund ist es notwendig den Promotor eines natürlichen Zielgenes eines nukleären Hormonrezeptors zu untersuchen, von dem gezeigt werden konnte, dass zwei NCoA-Proteine rekrutiert werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde daher das PSA-Gen (Prostate specific antigen) in der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LnCap ausgewählt. Eine Studie konnte zeigen, dass Paare von NCoA-1 und NCoA-3 oder NCoA-2 und NCoA-3 zum PSA-Promotor rekrutiert werden (Zhang et al., 2004b). Um den Einfluss der Überexpression der PAS-B-Domänen auf die Expression von PSA zu analysieren, wurden die PAS-B-Domänen von NCoA-1 (AS 260-370) und NCoA-3 (AS 265-375) in einen lentiviralen Vektor (pVIG-Flag) kloniert. Die Fragmente der PAS-B-Domänen entsprechen den Fragmenten, die in den Reporter-Gen-Experimenten eingesetzt wurden. Anschließend wurden LnCap-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten stabil transduziert. Als Kontrolle wurde der Leervektor pVIG-Flag verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde durch Koexpression von GFP im FACS-Gerät bestimmt und ist in Abbildung 3.17 exemplarisch dargestellt.

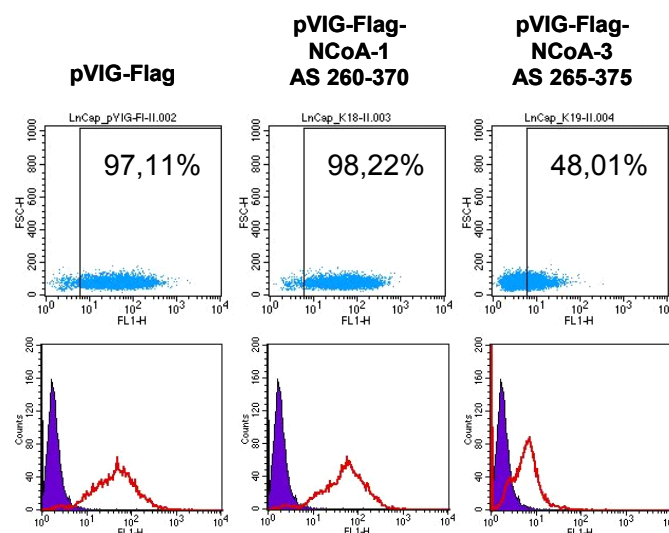


Abb. 3.17 Transduktionseffizienzen der PAS-B-Domänen-Fragmente von NCoA-1 und NCoA-3 in LnCap-Zellen

LnCap-Zellen wurden mit einer MOI von 0,2-2 transduziert. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte, basierend auf der Koexpression von GFP, mit Hilfe des FACS-Gerätes. Zur Kontrolle der mit der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370) und NCoA-3 (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375) transduzierten Zellen, wurde der Leervektor (pVIG-Flag) eingesetzt. Die Abbildung zeigt in der oberen Reihe, jeweils die GFP-negativen Zellen im linken Quadrat und die GFP-positive Zellpopulation im rechten Quadrat der Diagramme. In der unteren Reihe entspricht das violette Histogramm den GFP-negativen Kontrollzellen. Die durch das rote Histogramm gekennzeichnete Zellpopulation repräsentiert die GFP-positiven Zellen. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent ist jeweils angegeben.

Mit dem Leervektor (pVIG-Flag) und dem Konstrukt der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370) zeigten sich Transduktionseffizienzen von über 95%. Im Gegensatz dazu war die Transduktionseffizienz der NCoA-3-PAS-B-Domäne (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375) mit 48-54% deutlich geringer. Außerdem war die Intensität der GFP-Fluoreszenz schwächer.

Um die Überexpression der PAS-B-Domänen-Fragmente im Verhältnis zu den endogenen NCoA-Proteinen nachzuweisen, konnte keine Western-Blot-Analyse vorgenommen werden, da kein kommerziell erhältlicher Antikörper verfügbar war, der die entsprechenden Regionen der PAS-B-Domänen binden kann. Es wurde daher der mRNA-Gehalt mittels quantitativer RT-PCR in den transduzierten Zellen bestimmt. Dazu wurden Oligonukleotide eingesetzt, die innerhalb der PAS-B-Domänen von NCoA-1 bzw. NCoA-3 hybridisieren. Alle Werte wurden dabei gegen 18S-RNA normalisiert. Der relative mRNA-Gehalt der entsprechenden PAS-B-Domäne ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

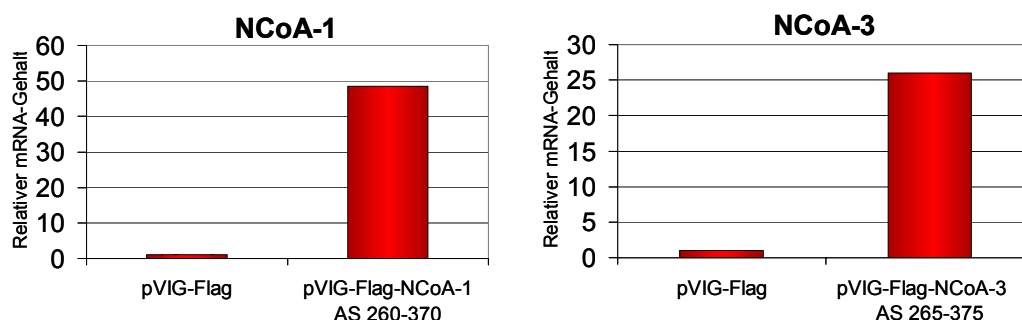


Abb. 3.18 Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 in den transduzierten LnCap-Zellen

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde der relative mRNA-Gehalt der PAS-B-Domänen-Fragmente von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370; links) oder NCoA-3 (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375; rechts) in den jeweiligen transduzierten Zellen, im Vergleich zu den mit dem Leervektor (pVIG-Flag)-transduzierten LnCap-Zellen bestimmt. Die Expression der PAS-B-Domänen-Fragmente wurde jeweils mit spezifischen Oligonukleotiden bestimmt. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und aus drei Einzelwerten gemittelt. Die Darstellung ist repräsentativ für zwei unabhängige Gruppen von transduzierten LnCap-Zellen und Experimenten.

Die Auswertung zeigte, dass die jeweiligen Fragmente der PAS-B-Domänen von NCoA-1 (18,8 - 48,5-fach) bzw. NCoA-3 (26 - 33,5-fach) im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen (pVIG-Flag) deutlich überexprimiert sind.

Bei beiden Fragmenten konnte somit eine Überexpression im Vergleich zu den endogenen NCoA-Proteinen nachgewiesen werden.

3.5.4.2 Einfluss der Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 auf die Transkriptionsaktivierung

Um den Effekt der Überexpression der NCoA-1- bzw. NCoA-3-PAS-B-Domäne auf die Transkriptionsaktivierung zu untersuchen, wurde die Expression des natürlichen Androgen-Rezeptor-Zielgenes PSA in den stabil transduzierten Zelllinien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die mit dem Leervektor (pVIG-Flag) und den entsprechenden Konstrukten der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370) und NCoA-3 (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375) transduzierten LnCap-Zellen zunächst für mindestens drei Tage in phenolrotfreiem Medium, das hormonfreies FCS enthält, inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit oder ohne Dihydrotestosteron (100 nM) für 16 Stunden. Als Kontrolle wurden die Zellen in der entsprechenden Verdünnung mit Ethanol behandelt. Anschließend erfolgte die Präparation der RNA aus den Zellen und die Untersuchung der PSA-Expression mit spezifischen Oligonukleotiden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR. Alle Werte wurden aus drei Einzelwerten (Triplikat) gemittelt und jeweils gegen den entsprechenden 18S-RNA-Wert normalisiert. In Abbildung 3.19 ist der relative mRNA-Gehalt von PSA in den jeweiligen Zelllinien dargestellt.

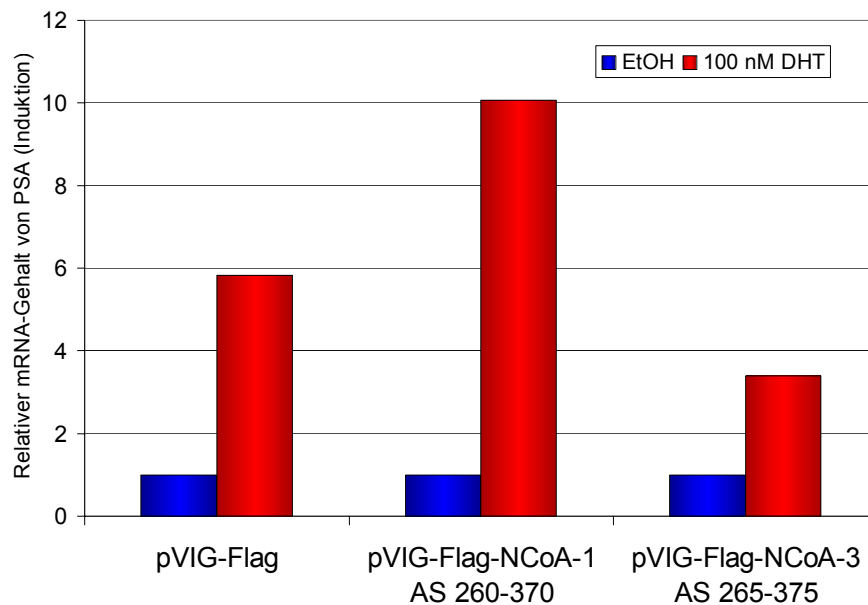


Abb. 3.19 Die Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 beeinflusst die Expression von PSA unterschiedlich

Die mit dem Leervektor (pVIG-Flag) oder der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370) oder NCoA-3 (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375) transduzierten LnCap-Zellen wurden für mindestens drei Tage in phenolrotfreiem Medium mit hormonfreiem FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT, 100 nM; rote Balken) oder Ethanol (EtOH; blaue Balken), in einer entsprechenden Verdünnung, für 16 Stunden. Die Bestimmung des relativen mRNA-Gehaltes von PSA (Prostate specific antigen) erfolgte mit Hilfe der quantitativen RT-PCR. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und aus drei Einzelwerten gemittelt. Die Darstellung ist repräsentativ für zwei unabhängige Gruppen von transduzierten LnCap-Zellen und Experimenten.

Die Überexpression der PAS-B-Domänen-Fragmente führte zu unterschiedlichen Ergebnissen für beide NCoA-Proteine. Im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen (pVIG-Flag) führte die Überexpression der PAS-B-Domäne von NCoA-1 (pVIG-Flag-NCoA-1 AS 260-370) zu einer stärkeren transkriptionellen Aktivierung und damit zu einer verstärkten Expression von PSA. Dabei wurde der relative mRNA-Gehalt von PSA annähernd verdoppelt. Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei dem Fragment der NCoA-3-PAS-B-Domäne (pVIG-Flag-NCoA-3 AS 265-375) eine verminderte Transkription und eine Reduzierung des relativen PSA-mRNA-Gehaltes um die Hälfte. Damit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 bzw. NCoA-3 Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung und daher auf die Expression natürlicher Zielgene von nukleären Hormonrezeptoren haben kann.

4. Diskussion

4.1 Die Interaktion von NCoA-Proteinen

Die Regulation der Transkription und damit der Expression von Genen basiert auf der Kooperation von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren bzw. Korepressoren. Die Koaktivatoren werden durch Transkriptionsfaktoren zu den Promotor- bzw. Enhancer-Regionen von Zielgenen rekrutiert und ermöglichen durch die Modifikation des Chromatins die Transkriptionsaktivierung. Zum Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen bei der Transkriptionsaktivierung ist es daher erforderlich, die vielfältigen Interaktionen zwischen Koaktivatoren zu untersuchen. Eine wichtige Gruppe von Koaktivatoren bilden die Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie. Die NCoA-Proteine haben eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung weiterer Koaktivatoren, die durch ihre HAT- bzw. HMT-Aktivität das Chromatin modifizieren und spielen möglicherweise auch bei der direkten Modifikation des Chromatins durch Acetylierung (Spencer et al., 1997 und Chen et al., 1997) und bei dem Kontakt zu generellen Transkriptionsfaktoren (Takeshita et al., 1996) eine Rolle. Für die Funktion der NCoA-Proteine sind daher vielfältige Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und anderen Koaktivatoren essentiell. bHLH/PAS-Domänen konnten in vielen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, in denen sie Homo- oder Heterodimerisierungen vermitteln (zusammengefasst in Taylor and Zhulin, 1999). Aus diesem Grund hatten einige Publikationen postuliert, dass NCoA-Proteine über die aminoterminalen bHLH/PAS-Domänen ebenfalls homo- bzw. heterodimerisieren können. So wurde einerseits eine Assoziation von NCoA-Proteinen in Gelfiltrations-Experimenten (McKenna et al., 1998), als auch die Rekrutierung von zwei NCoA-Proteinen zu spezifischen Promotoren postuliert (Zhang et al., 2004b). Eine direkte Interaktion über die N-terminalen Regionen konnte jedoch nicht gezeigt werden, obwohl die bHLH/PAS-Domänen für die Expression dieser Zielgene benötigt werden. Frühere Studien haben die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit einem LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 demonstriert (Litterst and Pfitzner, 2001 und 2002). Das Vorhandensein von LXXLL-Motiven in der Aminosäure-Sequenz von NCoA-

Proteinen und der LXXLL-Motiv-interagierenden PAS-B-Domäne von NCoA-1, könnte deshalb vielfältige Interaktionsmöglichkeiten beinhalten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die PAS-B-Domäne und die LXXLL-Motive der NCoA-Proteine eine Rolle bei der Interaktion von NCoA-Proteinen spielen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob spezifische Unterschiede zwischen den NCoA-Proteinen vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurden zunächst Koimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Dabei wurde erstmals eine Interaktion von endogenem NCoA-1 und NCoA-3 in zwei verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 3.1). Dieses Ergebnis bestätigte die früheren Gelfiltrations-Experimente, die eine Assoziation von NCoA-1 und NCoA-2 in Koaktivator-Komplexen postulierten (McKenna et al., 1998). In diesen Experimenten wurden durch die Zugabe eines gegen NCoA-1 gerichteten Antikörpers nicht nur Fraktionen die NCoA-1 enthalten, sondern auch NCoA-2, signifikant zu Fraktionen mit Proteinkomplexen eines höheren Molekulargewichtes verschoben. Jedoch konnte dadurch nicht die Frage beantwortet werden, ob NCoA-Proteine direkt miteinander interagieren können und über welche Domänen eine direkte Interaktion von NCoA-Proteinen erfolgt. Eine solche direkte Interaktion wurde bislang nur bei GRIP1 (NCoA-2) postuliert (Liu et al., 2006). Die dort untersuchte Homodimerisierung erfolgt jedoch im Wesentlichen über C-terminale Regionen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit allen murinen Vollängen-Proteinen der NCoA-Koaktivator-Familie *in vitro* und mit dem Vollängen-NCoA-1 in Zellen interagiert (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Ferner konnte auch demonstriert werden, dass sich diese Interaktion nicht nur auf die PAS-B-Domäne von NCoA-1 beschränkt, sondern dass die PAS-B-Domänen aller drei humaner NCoA-Proteine mit allen humanen Vollängen-Proteinen interagieren können (Abb. 3.5). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die PAS-B-Domäne nicht nur die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor STAT6 vermitteln kann (Litterst and Pfitzner 2001 und 2002), sondern auch mit den Mitgliedern der eigenen Koaktivator-Familie. Im Gegensatz zu der STAT6/NCoA-1-Interaktion zeigt sich keine Beschränkung auf die PAS-B-Domänen eines einzelnen NCoA-Familienmitgliedes. Diese Interaktion würde somit vielfältige Kombinationen von Homo- oder Heterodimerisierungen bei der Rekrutierung von Paaren von NCoA-Proteinen zu Promotor- bzw. Enhancer-Regionen ermöglichen.

Spezifische Kombinationen von NCoA-Proteinen könnten promotorspezifisch sein, wie sich dies bereits bei der Rekrutierung von NCoA-Protein-Paaren zu Promotoren mit einem klassischen HRE (Hormone responsive element) gezeigt hat (Zhang et al., 2004b). Dabei wurde durch Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente die Rekrutierung von NCoA-3 mit NCoA-1 oder NCoA-2, aber nicht von NCoA-1 mit NCoA-2 nachgewiesen. Eine Homodimerisierung kann allerdings mit dieser Methode bei endogenen Proteinen nicht nachgewiesen werden, so dass es möglich ist, dass auch Homodimere bestehend aus z.B. zwei NCoA-1-Proteinen rekrutiert werden. Dafür spricht auch, dass die in dieser Arbeit gefundene Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit dem eigenen Volllängen-Protein stärker ist, als die Interaktion der PAS-B-Domänen der anderen Mitgliedern der NCoA-Familie mit dem NCoA-1-Volllängen-Protein (Abb. 3.5). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der verschiedenen NCoA-Proteine nicht unbedingt über die gleichen Bereiche, Domänen oder Bindungsmotive erfolgen muss. Neben den unterschiedlichen Expressionsprofilen, die die drei NCoA-Proteine aufweisen (zusammengefasst in Xu and O'Malley, 2002 und Xu and Li, 2003) und damit der Verfügbarkeit eines bestimmten NCoA-Proteines, könnten auch unterschiedliche Affinitäten bei der Interaktion zwischen NCoA-Proteinen eine Rolle spielen.

4.2 Bindung der PAS-B-Domänen an die CID/AD1

In der Literatur konnten bisherige Studien zeigen, dass PAS-Domänen Protein-Protein-Interaktionen mit anderen PAS-Domänen (Homo- und Heterodimerisierungen) (Huang et al., 1993 und Lindebro et al., 1995) oder mit einem LXXLL-Motiv (Litterst and Pfitzner, 2002) vermitteln. In dieser Arbeit wurde in GST-Interaktionsstudien gezeigt, dass die PAS-B-Domänen aller drei NCoA-Familienmitglieder mit einer Region von NCoA-1 spezifisch interagiert, die zwei LXXLL-Motive in der CID/AD1 (AS 804-1032) umfasst (Abb. 3.4 B und Abb. 3.6). Die anderen Domänen von NCoA-1, die LXXLL-Motive beinhalten, die NID (AS 569-805) und die AD2 (AS 1258-1442), zeigten im Vergleich zu dieser Interaktion fast keine oder nur eine sehr geringfügige Interaktion.

Außerdem konnte die Region in der CID/AD1 weiter auf die Aminosäuren 901-970 eingeschränkt werden (Abb. 3.8 B). Dieser Bereich enthält beide LXXLL-Motive, sowie die vollständige Region, die für die Interaktion mit dem Koaktivator CBP notwendig ist (Abb. 3.8 A; Sheppard et al., 2001). Es zeigten sich, ebenso wie bei der Interaktion der PAS-B-Domänen mit den drei Vollängen-Proteinen, keine unterschiedlichen Spezifitäten der drei NCoA-Proteine für verschiedene Domänen. Dies unterstreicht, dass die NCoA-Proteine möglicherweise eine funktionelle Redundanz aufweisen könnten, da verschiedene NCoA-Proteine über die gleichen Domänen miteinander interagieren. Das bedeutet aber auch, dass bei der Interaktion von NCoA-Proteinen eine Konkurrenz um gleiche Bindungsstellen bestehen kann, die z.B. durch die unterschiedlichen Expressionsprofile mitbestimmt wird. Eine Interaktion von NCoA-1 über die N-terminalen bHLH/PAS-Domänen konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.7 B). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der bHLH/PAS-Familie, wie z.B. AhR oder ARNT (Taylor and Zhulin, 1999; Gu et al., 2000 und Kewley et al., 2004), scheint daher die Dimerisierung nicht über die bHLH/PAS-Domänen zu erfolgen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die postulierten Interaktionen von NCoA-Proteinen in der Literatur (McKenna et al., 1998 und Zhang et al., 2004b) einer Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 zuzuschreiben ist und nicht wie vorausgesetzt über eine Dimerisierung der N-terminalen Domänen. Damit zeigt sich ein prinzipieller Unterschied zwischen den NCoA-Proteinen und den anderen Mitgliedern der bHLH/PAS-Proteinfamilie. Bei den meisten Mitgliedern der bHLH/PAS-Proteinfamilie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, in denen der basische Teil der bHLH-Domänen für die DNA-Bindung der Dimere sorgt, während die Dimerisierung durch die HLH-Region vermittelt wird. Die PAS-Domänen dienen dabei als eine zweite Dimerisierungsoberfläche, die für Spezifität und Stabilität der Interaktionen wichtig ist (Pongratz et al., 1998 und Reisz-Porszasz et al., 1994). Bei NCoA-Proteinen konnte bislang keine DNA-Bindung nachgewiesen werden. Trotzdem besitzen die bHLH/PAS-Domänen der NCoA-Proteine wichtige Funktionen bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Dies kann man nicht nur an den in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen sehen, sondern auch an der Bindung anderer Koaktivatoren, wie z.B. CoCoA und GAC63 (Kim et al., 2003 und Chen et al., 2005) oder an der

Bindung der PAS-B-Domäne an STAT6 (Litterst and Pfitzner, 2001 und 2002), die für die Transkriptionsaktivierung essentiell ist. Dennoch konnte z.B. die Interaktion von mNCoA-1 mit den bHLH/PAS-Transkriptionsfaktoren ARNT und AhR nachgewiesen werden (Beischlag et al., 2002). In diesem Fall interagiert eine Region von mARNT, die die Aminosäuren 1-687 umfasst bzw. der Volllängen-AhR mit einer Region von mNCoA-1 mit den Aminosäuren 763-1033 bzw. 896-1200. Dabei ist auffallend, dass die Region von NCoA-1 auch die CID/AD1 umfasst. Allerdings scheint die N-terminale Region mit den Aminosäuren 763-895 von NCoA-1, ohne die LXXLL-Motive, für die Interaktion mit ARNT wichtiger zu sein, als der Bereich mit den LXXLL-Motiven. Außerdem ist in diesem Fall die bHLH-Domäne von ARNT bzw. die glutaminreiche Region in der Transaktivierungsdomäne von AhR (Kumar and Perdew, 1999) für die Interaktion verantwortlich. Eine Interaktion mit der N-terminalen Region von NCoA-1 (AS 1-360) konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System und in GST-Interaktionsstudien nicht nachgewiesen werden (Beischlag et al., 2002). Damit gehört die in dieser Arbeit identifizierte Interaktion von bHLH/PAS-Proteinen, wie die Interaktion von NCoA-1 mit ARNT bzw. AhR oder auch HIF-1 α (Carrero et al., 2000), zu den Beispielen, in denen die Interaktion zweier bHLH/PAS-Proteine nicht über die gegenseitige Interaktion ihrer bHLH/PAS-Domänen vermittelt wird.

Die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 ermöglicht eine intermolekulare und intramolekulare Interaktion von NCoA-Proteinen. Die Annahme einer möglichen intramolekularen Interaktion wird dadurch unterstützt, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit dem eigenen Volllängen-Protein *in vitro* stärker interagiert, als die PAS-B-Domänen der anderen NCoA-Familienmitglieder (Abb. 3.5). Die PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 zeigen einen solchen Unterschied nicht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass vor allem bei NCoA-1 eine intramolekulare Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der eigenen CID/AD1 unter bestimmten Bedingungen bevorzugt wird. Jedoch könnte auch eine bevorzugte Homodimerisierung von NCoA-1-Proteinen möglich sein. In jedem Fall deutet dieses Ergebnis an, dass NCoA-Proteine, neben der oben beschriebenen funktionellen Redundanz, auch durch Unterschiede zum Beispiel in der Affinität zu gleichen Bindungsregionen, spezifische Funktionen haben können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob eine intramolekulare Interaktion von NCoA-Proteinen über die PAS-B-Domäne und die CID/AD1 erfolgen kann. Dabei stellt sich die Frage, ob eine solche Interaktion sterisch überhaupt möglich ist und welche Methodik geeignet ist, dies eindeutig nachzuweisen. Ein eindeutiger Nachweis der intramolekularen Interaktion könnte nur durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines NCoA-Proteines erfolgen. Aus diesem Grund wurde versucht in einer Kooperation mit Stefan Becker (Max-Planck-Institut, Göttingen) ein NCoA-1-Fragment, das die Aminosäuren 257-970 umfasst und damit die PAS-B-Domäne und die CID/AD1, zu kristallisieren und durch NMR-Spektroskopie zu analysieren. Diese Experimente führten bisher jedoch noch nicht zu der Auflösung einer dreidimensionalen Struktur, aufgrund des Löslichkeitsverhaltens des Proteines. Daher ist es bislang noch nicht möglich eine eindeutige Aussage über eine intramolekulare Interaktion zu treffen.

Bei der Regulation einer inter- oder intramolekularen Interaktion könnten sekundäre Modifikationen eine Rolle spielen. Dies könnte auch für den Übergang von einer intramolekularen Interaktion zu einer Interaktion mit einem anderen Koaktivator (z.B. p300/CBP) oder umgekehrt wichtig sein (siehe auch Abschnitt 4.4). Es wurde schon bei vorhergehenden Studien postuliert, dass sekundäre Modifikationen Einfluss auf die Interaktion oder Aktivität von NCoA-Proteinen haben können. So konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung von NCoA-3 durch p300, an drei aminoterminal zum ersten LXXLL-Motiv gelegenen Lysin-Resten (K626, K629 und K630) in der NID, die Interaktion von NCoA-3 zum Östrogen-Rezeptor destabilisiert (Chen et al., 1999b). Die Destabilisierung dieser Interaktion führt dann zur Lösung von NCoA-3 vom Östrogen-Rezeptor und damit zur Dissoziation des NCoA/p300/CBP-Koaktivator-Komplexes von der Promotor-Region. Ebenso wurde postuliert, dass eine Methylierung von NCoA-3 durch CARM1 die Bindung zu CARM1 beeinflusst und zur Dissoziation des Koaktivator-Komplexes beiträgt (Feng et al., 2006 und Naeem et al., 2007). Aber auch die Methylierung von CBP durch CARM1 scheint einen wichtigen Einfluss auf die durch GRIP1 (NCoA-2)-abhängige Transkriptionsaktivierung zu haben (Chevillard-Briet et al., 2002).

Die in früheren Studien postulierte spezifische Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und der Transaktivierungsdomäne von STAT6 (Litterst

and Pfitzner, 2001 und Razeto et al., 2004) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es konnte zwar keine Interaktion mit der NCoA-2-PAS-B-Domäne nachgewiesen werden, aber im Gegensatz dazu wurde eine Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-3 mit einem STAT6-TAD-Fragment in GST-Interaktionsstudien gezeigt (Abb. 3.6). Die bisherige Annahme der spezifischen Interaktion zwischen NCoA-1 und STAT6, stützte sich dabei auf zwei verschiedene Ergebnisse. Zum einen konnte in Luziferase-Reporter-Experimenten in HepG2-Zellen gezeigt werden, dass nur NCoA-1, aber nicht NCoA-2 oder NCoA-3, IL-4-abhängig die Expression des Reportergens als Koaktivator verstärkt stimulieren konnte (Litterst and Pfitzner, 2001). Zum anderen wurde in GST-Interaktionsstudien mit einem GST-markierten Fragment der STAT6-Transaktivierungsdomäne die spezifische Interaktion mit NCoA-1 nachgewiesen (Litterst and Pfitzner, 2001 und Razeto et al., 2004). NCoA-2 zeigte dabei als Vollängen-Protein keine bzw. deren PAS-B-Domäne nur eine sehr schwache Interaktion, während bei NCoA-3 in keinem Fall eine Interaktion mit STAT6 nachzuweisen war. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den verschiedenen Ansätzen der GST-Interaktionsstudien liegen. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Fall sind die PAS-B-Domänen der NCoA-Proteine GST-markiert und das STAT6-Fragment *in vitro*-translatiert, während dies in den vorherigen Studien genau umgekehrt war. Die GST-Markierung könnte daher einen Einfluss auf die Interaktion haben und somit den Kontakt zwischen dem STAT6-Fragment und der NCoA-3-PAS-B-Domäne behindert haben. Zwar zeigen die Luziferase-Reporter-Experimente eine spezifische Koaktivierung durch NCoA-1, jedoch wäre es möglich, dass es sich dabei um einen zelltypspezifischen Effekt handelt. Diese These wird unterstützt durch eine Publikation, die zeigt, dass NCoA-3 ein Koaktivator der STAT6-vermittelten Transkriptionsaktivierung ist (Arimura et al., 2004). In diesem Fall vermittelt p300 eine indirekte Interaktion von NCoA-3 und STAT6, die bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung in 293T- und M12.4.1-Zellen wichtig ist. Die Überexpression eines CID/AD1-Fragmentes von NCoA-3 führt dabei zu einer verminderten Interaktion von NCoA-3 und STAT6 und einer reduzierten Transkriptionsaktivierung. Dies entspricht einem ähnlichen Mechanismus der Interaktion von NCoA-1 und STAT6, bei dem postuliert wurde, dass NCoA-1 die Bindung von p300/CBP an STAT6 stabilisiert (Litterst

and Pfitzner, 2001). Dies zeigt, dass ebenso wie bei den nukleären Hormonrezeptoren, eine zelltyp- und promotorspezifische Rekrutierung von Koaktivatoren auch bei STAT6 vorhanden zu sein scheint. Dies könnte sowohl die Rekrutierung spezifischer Koaktivatoren durch den Transkriptionsfaktor betreffen, als auch die Interaktion der Koaktivatoren in den Koaktivator-Komplexen untereinander. Inwieweit eine direkte Interaktion von STAT6 und NCoA-3 dabei eine Rolle spielt, bleibt zu klären. Vorläufige und unpublizierte Resultate unserer Arbeitsgruppe bestätigen, dass die GST-markierte NCoA-3-PAS-B-Domäne mit dem *in vitro*-translatierten Fragment der STAT6-TAD in GST-Interaktionsstudien zwar interagiert, dass jedoch im Gegensatz zu NCoA-1 die Interaktion mit dem Volllängen-STAT6 deutlich herabgesetzt und fast nicht mehr vorhanden ist (Daten nicht gezeigt, Tobias Münz, AG Pfitzner, Institut für Biochemie und Biophysik, FSU Jena). Dies könnte andeuten, dass eine Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne von NCoA-3 und der TAD von STAT6 zwar prinzipiell möglich ist, aber bei Vorhandensein des gesamten STAT6-Proteins aus z.B. sterischen Gründen schlechter erfolgen kann.

4.3 Vergleich der Bindungsspezifitäten der NCoA-Proteine

Die drei Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie haben eine unterschiedliche Bindungsspezifität bei der Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 von NCoA-1 und NCoA-3. Alle drei PAS-B-Domänen konnten in den Interaktionsstudien mit der verkürzten CID/AD1 von NCoA-1, die die Aminosäuren 901-970 umfasst, interagieren (Abb. 3.8 B). Jedoch zeigten sich Unterschiede bei der Verwendung von zwei weiter verkürzten Fragmenten (Abb. 3.8 A). Die Interaktion mit einem aminoterminalen Fragment der CID/AD1 (AS 901-937), das beide LXXLL-Motive enthält, zeigte nur mit der PAS-B-Domäne von NCoA-1 eine identische Stärke. Die Interaktion mit den NCoA-2- und NCoA-3-PAS-B-Domänen war deutlich schwächer (Abb. 3.8 B). Das carboxyterminale Fragment (AS 938-970), das keines der beiden LXXLL-Motive enthält, zeigte keine Bindung mehr an die PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 und eine deutlich schwächere Bindung an die NCoA-1-PAS-B-

Domäne. Diese unterschiedlichen Bindungsspezifitäten konnten durch die Kompetitions-Experimente mit Peptiden, die jeweils die einzelnen LXXLL-Motive der CID/AD1 repräsentieren, bestätigt werden (Abb. 3.9 B). So zeigten sich die stärksten Effekte bei der Interaktion der NCoA-1-PAS-B-Domäne durch die jeweilige Zugabe eines Peptides. Dabei zeigte das Peptid, das das Motiv 4 repräsentiert, bei den geringsten eingesetzten Konzentrationen eine etwas stärkere Competition. Im Gegensatz dazu konnten die Interaktionen der PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 nur geringfügig oder überhaupt nicht beeinflusst werden. In diesen Fällen zeigte das Peptid, das das LXXLL-Motiv 5 repräsentierte, einen stärkeren Effekt als das Peptid LXXLL-Motiv 4. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass für die Bindung der PAS-B-Domäne von NCoA-1, im Vergleich zu NCoA-2 und NCoA-3, andere Bindungsmotive in der CID/AD1 von NCoA-1 notwendig sind (Abb. 4.1).

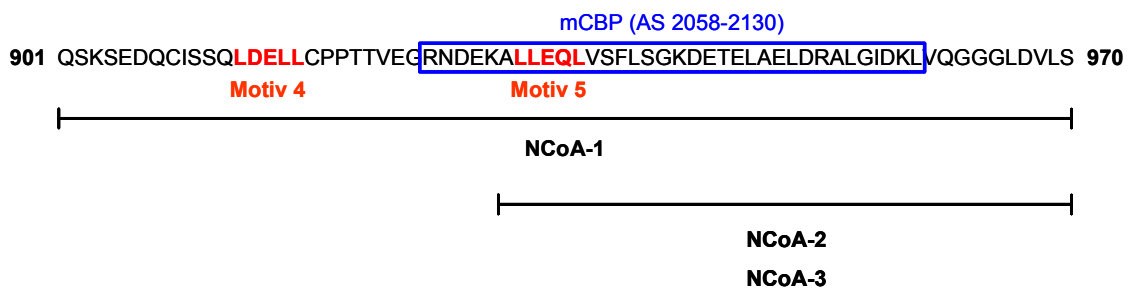


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der CID/AD1 von NCoA-1

Die Aminosäure-Sequenz der Region der CID/AD1, die die Aminosäuren 901-970 umfasst, ist dargestellt. Sie enthält beide LXXLL-Motive (rot), sowie den vollständigen Bereich, der die Interaktion mit CBP vermittelt (AS 926-960, blaue Umrandung) (Sheppard et al., 2001). Die Bindungsregionen der PAS-B-Domänen von NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 sind schematisch dargestellt.

Die PAS-B-Domäne von NCoA-1 bindet über einen größeren Bereich bzw. besitzt verschiedene Bindungsregionen in der CID/AD1 von NCoA-1. Dabei konnten die Kompetitions-Versuche mit den LXXLL-repräsentierenden Peptiden und die Interaktionsstudien mit den amino- und carboxyterminalen Fragmenten der CID/AD1 demonstrieren, dass beide LXXLL-Motive für die Interaktion und deren Stabilität wichtig sind. Das in der CID/AD1 N-terminal gelegene LXXLL-Motiv 4 scheint dabei etwas wichtiger für die Interaktion zu sein, als das C-

terminaler gelegene LXXLL-Motiv 5, da es eine stärkere Wirkung bei der geringsten eingesetzten Peptid-Konzentration gezeigt hat. Die Bindung der NCoA-1-PAS-B-Domäne an das carboxyterminale Fragment (AS 938-970), das keine LXXLL-Motive enthält, ist zwar vorhanden, allerdings ist sie schwächer. Dies verdeutlicht, dass der Kontakt zwar über verschiedene Regionen innerhalb der CID/AD1 erfolgt, dass die LXXLL-Motive jedoch für die Stabilität der Interaktion entscheidend sind. Das Vorhandensein einer größeren Interaktionsregion bzw. mehrerer Interaktionsregionen könnte auch eine Erklärung für die stärkere Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 mit dem eigenen Vollängen-Protein, im Vergleich zu den Interaktionen mit den PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3, sein (Abb. 3.5). Dazu übereinstimmend ist auch, dass die Peptide, die die LXXLL-Motive in der CID/AD1 von NCoA-1 repräsentieren, die eindeutig stärksten Kompetitionen bei der Interaktion der NCoA-1-PAS-B-Domäne und der NCoA-1-CID/AD1 zeigten. Diese Ergebnisse unterstützen daher die Vermutung, dass die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 von NCoA-1 stärker ist, als zwischen den anderen Mitgliedern der NCoA-Familie.

Die Interaktion mit den PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 werden hingegen von Bindungsregionen im carboxyterminalen Bereich der CID/AD1 von NCoA-1 vermittelt (Abb. 4.1). Dabei spielen die LXXLL-Motive für die Bindung eine weniger wichtige Rolle. Die Kompetitions-Versuche mit den Einzelmotiv-Peptiden (Abb. 3.9 B) haben verdeutlicht, dass das LXXLL-Motiv 4 keine Funktion bei der Bindung der NCoA-2- oder NCoA-3-PAS-B-Domäne besitzt. Das LXXLL-Motiv 5, dessen Peptid einen geringen Einfluss auf die Bindung gezeigt hat, scheint jedoch noch am äußeren Rand in der Bindungsregion zu liegen. Allerdings demonstriert dies auch, dass es für die Bindung allein nicht essentiell ist. Die Region, die C-terminal des LXXLL-Motives 5 liegt, spielt mindestens eine ebenso wichtige Rolle für den Kontakt. Dies wird verdeutlicht bei den Kompetitions-Experimenten mit dem Peptid, das die beiden LXXLL-Motive, sowie die carboxyterminale Region der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 901-970) enthält (Abb. 3.11 B). Dabei zeigt vor allem der starke Effekt dieses Peptides auf die Interaktion der NCoA-3-PAS-B-Domäne, dass die carboxyterminale Region wichtig für die Bindung ist. Bei der NCoA-2-PAS-B-Domäne ist dieser Effekt zwar nicht ganz so deutlich, jedoch deutlicher als bei

den Einzelmotiv-Peptiden. Dies spiegelt jedoch noch nicht die gesamte Komplexität der Interaktionsoberfläche wider. Die GST-Interaktionsstudien mit den amino- und carboxyterminalen Fragmenten der CID/AD1 (Abb. 3.8 B) zeigen, dass die C-terminale Region allein ebenso für eine Interaktion nicht ausreichend ist. Beide Fragmente zeigen eine deutlich verminderte Interaktion (aminoterminales Fragment mit LXXLL-Motiven) oder keine Interaktion (carboxyterminales Fragment ohne LXXLL-Motive) mit den PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3. Das lässt darauf schließen, dass die Bindungsregion, die für die Interaktion mit der NCoA-2- bzw. der NCoA-3-PAS-B-Domäne essentiell ist, das LXXLL-Motiv 5 und die nachfolgende carboxyterminale Region umfasst. Dabei scheint es entscheidend zu sein, dass der Bereich um das LXXLL-Motiv 5 mit den unmittelbar nachfolgenden Aminosäuren intakt ist. Damit überlappt die Bindungsregion der NCoA-2- und NCoA-3-PAS-B-Domäne in der CID/AD1 nahezu mit der Bindungsregion von CBP (AS 926-960) (Sheppard et al., 2001) (Abb. 4.1). Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse mit dem GST-Fusionsprotein von CBP, das die Region enthält, die für die Interaktion mit NCoA-1 verantwortlich ist (AS 2058-2130) (Abb. 3.8 B). Dieses Fusionsprotein zeigt nahezu keine Interaktion mehr mit dem aminoterminalen Fragment der CID/AD1 und keine Bindung an das carboxyterminale Fragment. Somit zeigt es ein ähnliches Bindungsverhalten, wie die PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3. Die Bindungsstelle der NCoA-1-PAS-B-Domäne überlappt zwar auch mit der CBP-Interaktionsregion, kann jedoch aufgrund der unterschiedlichen Bindungsregionen auch an die aminoternale Hälfte der CID/AD1 von NCoA-1 binden.

Vergleicht man die Ergebnisse der eingeschränkten CID/AD1 von NCoA-1 (AS 901-970) und NCoA-3 (AS 1022-1092), zeigen sich ebenso unterschiedliche Bindungsspezifitäten für die drei NCoA-Familienmitglieder. Dabei interagiert das NCoA-3-CID/AD1-Fragment nur mit der NCoA-1-PAS-B-Domäne (Abb. 3.12 B). Im gleichen Maß interagiert das CBP-Fragment mit der NCoA-Protein-Interaktionsregion mit beiden CID/AD1-Fragmenten. Zusammen mit den vorher diskutierten Ergebnissen der CID/AD1 von NCoA-1 unterstreichen diese Resultate, dass für die Interaktionen bei denen NCoA-2 oder NCoA-3 beteiligt sind, andere Bindungsmotive in den PAS-B-Domänen bzw. in der CID/AD1 erforderlich sind. Diese Unterschiede basieren auf den teilweise voneinander

abweichenden Aminosäure-Sequenzen bzw. Strukturen in den jeweiligen Domänen. So weist z.B. die CID/AD1 von NCoA-3 hinter dem Bereich des LXXLL-Motivs 5 (LLDQL) ein weiteres klassisches LXXLL-Motiv (LHTLL) auf, das bei den anderen NCoA-Proteinen nicht vorhanden ist. (Abb. 3.12 A). Bei den Kompetitions-Versuchen mit den Peptiden der CID/AD1 von NCoA-1 bzw. NCoA-3 (Abb. 3.11 B), die beide LXXLL-Motive umfassen, bestätigen sich die unterschiedlichen Bindungsmotivspezifitäten. Es ist jedoch noch unklar, weshalb die Interaktion der PAS-B-Domäne von NCoA-1 beim Einsatz des CID/AD1-Fragmentes von NCoA-1, aufgrund des additiven Effektes durch die Konkurrenz beider LXXLL-Motive, nicht stärker inhibiert wird. Außerdem zeigt sich mit dem CID/AD1-Peptid von NCoA-3 kein inhibitorischer Effekt. Dies könnte man jedoch wiederum mit der stärkeren Interaktion der NCoA-1-PAS-B-Domäne und CID/AD1 erklären und würde somit die vorherigen Ergebnisse bestätigen.

Zur weiteren Bestimmung der unterschiedlichen Bindungsspezifitäten zwischen den drei NCoA-Proteinen ist es notwendig in zukünftigen Untersuchungen, die Interaktionsdomänen weiter einzuschränken und zu kartieren. Gleichzeitig könnten auch strukturelle Analysen Aufschluss über die unterschiedlichen Interaktionsmechanismen geben. Dabei könnte ein Vergleich gezogen werden zu den Mechanismen bei den Interaktionen von NCoA-Proteinen und nukleären Hormonrezeptoren.

4.4 Rolle der PAS-B-CID/AD1-Interaktion bei der Bildung von Koaktivator-Komplexen

NCoA-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Koaktivator-Komplexen. Die unterschiedlichen Domänen der NCoA-Proteine vermitteln die Interaktion mit verschiedenen Koaktivatoren und Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitt 1.2.2). Dabei ist vor allem die Interaktion der NCoA-Proteine mit den Koaktivatoren p300 und CBP über die CID/AD1 von entscheidender Bedeutung. Durch die Interaktion der NCoA-Proteine mit p300/CBP erfolgt die Stabilisierung der Bindung von p300/CBP an die nukleären Hormonrezeptoren (Li et al., 2000;

Sheppard et al., 2001 und Shang et al., 2002). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf einen neuen und, zu den bisher vorhandenen Modellen, ergänzenden Mechanismus der Koaktivator-Rekrutierung zu Promotor- bzw. Enhancer-Regionen hin. Dies gilt nicht nur für die Interaktion mit dem Koaktivator CBP über die CID/AD1 und die postulierte Rekrutierung von zwei NCoA-Proteinen zu spezifischen Promotoren (Zhang et al., 2004b), sondern auch für die Bindung der PAS-B-Domäne von NCoA-1 an die Transaktivierungsdomäne von STAT6. Um die physiologische Bedeutung der identifizierten Interaktion zu untersuchen, wurden in zwei verschiedenen Ansätzen die beiden Domänen entweder überexprimiert oder in einem Überschuss zugegeben. Dabei sollte analysiert werden, ob diese Domänen einen dominant negativen Effekt auf die Interaktion von NCoA-1 mit CBP bzw. STAT6 haben. Solche dominant negativen Effekte könnten von physiologischer Relevanz sein, wenn NCoA-Proteine unter pathologischen Bedingungen überexprimiert werden und dadurch einen Einfluss auf die Bildung und Rekrutierung von Koaktivator-Komplexen aufweisen. Es zeigte sich in den Koimmunopräzipitations-Experimenten, dass die Überexpression der PAS-B-Domäne von NCoA-1, die Interaktion der eigenen CID/AD1 (AS 804-1032) mit einem CBP-Fragment, das den Bereich umfasst, der für die Interaktion mit NCoA-1 verantwortlich ist (AS 2058-2130) (Sheppard et al., 2001), deutlich hemmte (Abb. 3.14). Außerdem wurde in GST-Interaktionsstudien demonstriert, dass die Zugabe eines Überschusses des Peptides der CID/AD1 von NCoA-1 (AS 901-970), die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne von NCoA-1 und der STAT6-Transaktivierungsdomäne inhibierte und auf weniger als die Hälfte reduziert (Abb. 3.15 A und B). Damit zeigte sich, dass die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 die Bindung anderer Koaktivatoren, wie z.B. CBP, oder auch dem Transkriptionsfaktor STAT6 beeinflussen kann. Diese Kompetitionen für die gleichen bzw. überlappenden Bindungsstellen, können daher auch eine Rolle bei der Bildung von Koaktivator-Komplexen und bei der Rekrutierung von Koaktivatoren spielen. Aufgrund der vorhandenen Ergebnisse ergeben sich zwei Modelle für die durch STAT6-vermittelte und die durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung (Abb. 4.2 und Abb. 4.3).

Bei der durch STAT6-vermittelten Rekrutierung der Koaktivatoren NCoA-1 und p300/CBP würde eine inter- und intramolekulare Interaktion von NCoA-1 für die Assoziation bzw. Dissoziation der Koaktivatoren entscheidend sein, das in dem folgenden hypothetischen Modell dargestellt ist (Abb. 4.2). Zunächst kommt es zu der Bindung der PAS-B-Domäne an das LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6. Diese Bindung führt zur Auflösung der intermolekularen Interaktion zweier NCoA-1-Proteine und ermöglicht gleichzeitig die Interaktion von p300/CBP mit der CID/AD1 von NCoA-1 (Abb. 4.2; I). Dadurch wird die Bindung von STAT6 zu p300/CBP stabilisiert und die Acetylierung des Chromatins ermöglicht (Abb. 4.2; II). Nachfolgend kommt es dann zur Rekrutierung weiterer Koaktivatoren, der Kontaktierung der generellen Transkriptionsmaschinerie und schließlich zur Transkriptionsaktivierung.

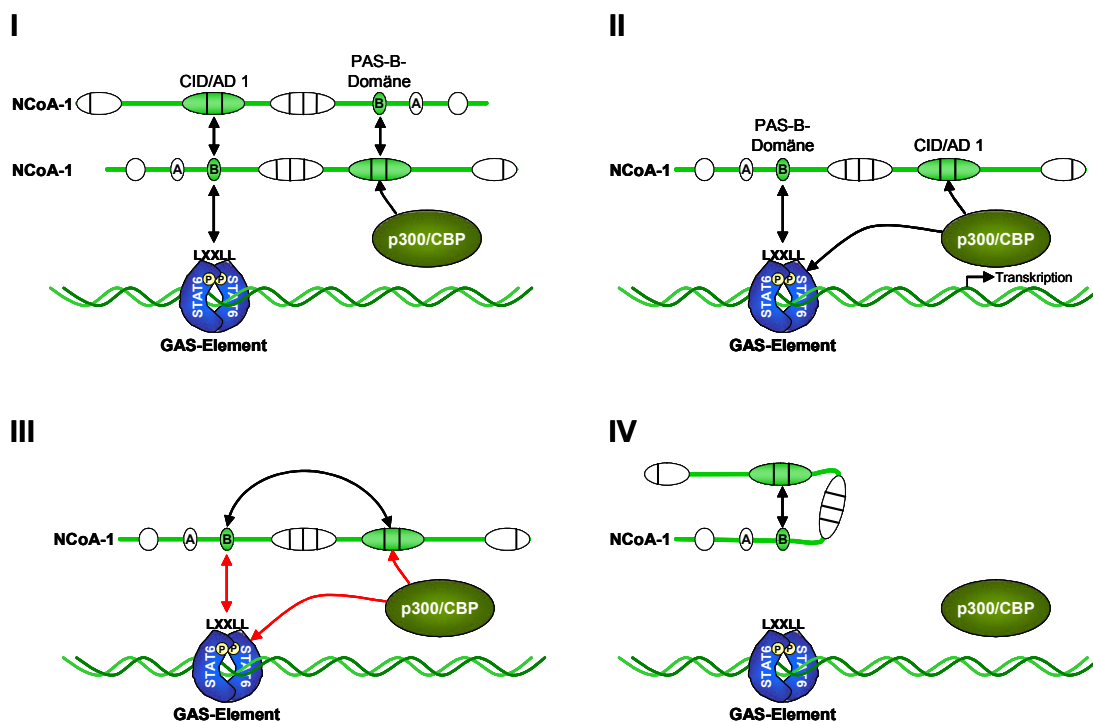


Abb. 4.2 Modell der durch STAT6-vermittelten Rekrutierung von NCoA-1 und p300/CBP bei der Transkriptionsaktivierung

Bei der durch STAT6-vermittelten Transkriptionsaktivierung kommt es nach der Bindung von STAT6 an seine Erkennungssequenz in der Promotor-Region (GAS-Element) zur Rekrutierung von NCoA-1. Die Bindung der PAS-B-Domäne zum LXXLL-Motiv in der STAT6-Transaktivierungsdomäne führt zur Auflösung der intermolekularen Interaktion zweier NCoA-1-Proteine. Gleichzeitig wird die Bindung von p300/CBP an die CID/AD1 von NCoA-1 ermöglicht (I). Dadurch wird die Interaktion von p300/CBP mit STAT6 stabilisiert und die Transkriptionsaktivierung erfolgt (II). Die intramolekulare Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 von NCoA-1 führt zu Konformationsänderungen und zur Auflösung der Interaktionen zu STAT6 und p300/CBP (III). Dadurch kommt es zur Destabilisierung des Kontaktes von p300/CBP und STAT6 und führt zur Dissoziation des Komplexes (IV).

Eine intramolekulare Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 von NCoA-1 hat in diesem Modell eine Funktion bei der Dissoziation des STAT6-Koaktivator-Komplexes. In diesem Fall kommt es durch die intramolekulare Interaktion zu Konformationsänderungen und führt dadurch zur Auflösung der Bindungen von STAT6 und p300/CBP (Abb. 4.2; III). Gleichzeitig wird die Interaktion zwischen STAT6 und p300/CBP destabilisiert und hat die Auflösung des trimeren Komplexes von NCoA-1, STAT6 und p300/CBP zur Folge (Abb. 4.2; IV).

Das zweite Modell umfasst die durch nukleäre Steroidhormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung. Es basiert auf der postulierten Rekrutierung von zwei NCoA-Proteinen zu spezifischen Promotoren von Zielgenen des Östrogen- und Androgen-Rezeptors (Zhang et al., 2004b). In diesem Modell wird die Korekrutierung von Paaren von NCoA-3 und NCoA-1 bzw. NCoA-2 durch die Interaktion der PAS-B-Domänen und der CID/AD1 der beiden NCoA-Proteine erreicht (Abb. 4.3 A und B). Die in der Literatur postulierte Dimerisierung und Korekrutierung der NCoA-Proteine durch die N-terminalen bHLH/PAS-Domänen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.7 B) und spielt daher in diesem Modell keine Rolle.

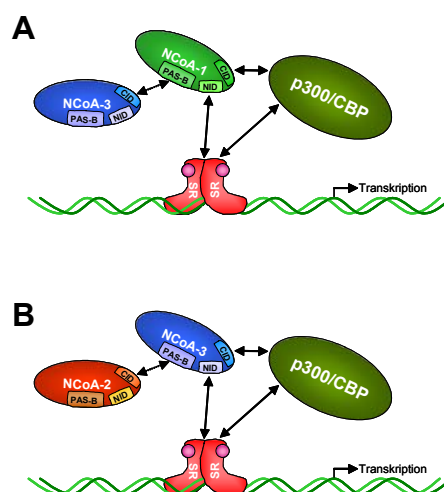


Abb. 4.3 Modell der Rekrutierung von Paaren von NCoA-Proteinen zu Zielgen-Promotoren von Steroidhormonrezeptoren

Die Korekrutierung von zwei NCoA-Proteinen durch die Steroidhormonrezeptoren (SR) zu Promotoren mit einem klassischen HRE (Hormone responsive element) erfolgt über die Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1. Die Bindung von p300/CBP zu den Steroidhormonrezeptoren wird durch ein NCoA-Protein verstärkt. Die Reihenfolge der Rekrutierung von Paaren von NCoA-3 und NCoA-1 (A) bzw. NCoA-3 und NCoA-2 (B) ist willkürlich dargestellt.

Die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 könnte, neben den genannten Interaktionspartnern (p300/CBP und STAT6), auch die Interaktion mit anderen Koaktivatoren beeinflussen. Dazu zählt der Koaktivator CoCoA, der mit den N-terminalen Regionen von NCoA-1 (AS 1-363) und GRIP1 (NCoA-2, AS 5-479) interagiert (Kim et al., 2003) und GAC63, bei dem eine Interaktion mit GRIP1 (AS 5-479) beschrieben wurde (Chen et al., 2005). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die postulierten Interaktionsregionen, größere N-terminale Regionen in den NCoA-Proteinen umfassen und somit auch eine gleichzeitige und nicht kompetitive Bindung stattfinden könnte. Weitere Koaktivatoren, bei denen eine Interaktion mit NCoA-Proteinen über die N-terminalen Regionen postuliert worden ist, sind Fli-I, das mit NCoA-2 (AS 5-730) interagiert (Lee et al., 2004), hMMS19, das an NCoA-3 (AS 92-408) bindet (Wu et al., 2001), CyclinT1, das eine Interaktion mit NCoA-2 (AS 1-97) zeigt (Kino et al., 2002) und BAF57, das mit NCoA-1 (AS 1-361) interagiert (Belandia et al., 2002). Aber auch bei dem negativen transkriptionellen Koregulator ANCO-1 wurde eine Interaktion mit der PAS-A- und vor allem mit der PAS-B-Domäne von NCoA-3 postuliert (Zhang et al., 2004a). Die vielfältigen beschriebenen Interaktionspartner der N-terminalen bHLH/PAS-Domänen verdeutlichen, dass eine Vielzahl verschiedener Koaktivatoren ähnliche Bindungsregionen in den NCoA-Proteinen besitzen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass diese Proteine mit der CID/AD1 um die gleichen oder überlappenden Bindungsstellen kompetieren. Die unterschiedlichen gewebetyp- und zelltypspezifischen Expressionsprofile dieser Koaktivatoren führen zu einer spezifischen Rekrutierung. Daher kann sich die Überexpression von NCoA-Proteinen, wie sie bei vielen verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 1.1), deutlich auf die Zusammensetzung von Koaktivator-Komplexen und damit auf die spezifische Genregulation auswirken.

4.5 Die Bedeutung der PAS-B-CID/AD1-Interaktion für die Transkriptionsaktivierung

Die Interaktion zwischen der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 kann, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, durch die Konkurrenz um gleiche Bindungsstellen einen Einfluss auf die Bildung und Rekrutierung von Koaktivator-Komplexen haben. Die Rekrutierung von Koaktivatoren ist ein entscheidender Prozess bei der Regulation der Genexpression. Um die Bedeutung dieser Interaktion auf die Transkriptionsaktivierung und die Expression von Zielgenen zu analysieren, wurden sowohl Reporter-Experimente durchgeführt, als auch die Expression eines endogenen Zielgens untersucht. Die Östrogen-Rezeptor- und Androgen-Rezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung wurde untersucht, da die Rekrutierung zweier NCoA-Proteine zu Zielgenen dieser beiden Steroidhormonrezeptoren an spezifische Promotoren postuliert worden war (Zhang et al., 2004b). Es sollte untersucht werden, ob durch die Überexpression der PAS-B-Domänen bzw. der CID/AD1, die Korekrutierung zweier NCoA-Proteine und damit die Transkriptionsaktivierung zu hemmen ist. In den Reporter-Experimenten zeigte sich kein bzw. nur ein geringer inhibitorischer Einfluss auf die durch den Östrogen-Rezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch die Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 (Abb. 3.16 B). Nur die Überexpression der CID/AD1 reduzierte die Expression der Luziferase deutlich. Diesen starken Effekt kann man einerseits durch die Bindung des CID/AD1-Fragmentes an p300/CBP und der damit inhibierten Interaktion zwischen den NCoA-Proteinen und p300/CBP erklären, die zu einer wesentlichen Destabilisierung der Interaktion zwischen dem Östrogen-Rezeptor und p300/CBP führt (Li et al., 2000; Sheppard et al., 2001 und Shang et al., 2002). Zum anderen könnte die Bindung des überexprimierten Fragmentes an die PAS-B-Domäne der NCoA-Proteine in einer Konkurrenz mit weiteren Koaktivatoren, wie z.B. CoCoA und GAC63, resultieren. Diese doppelte Inhibition der Interaktionen könnte daher zu der deutlichen Reduktion der Transkriptionsaktivierung und Expression führen. Außerdem könnten diese Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung der CID/AD1 zu p300/CBP stärker ist, als die Bindung zur PAS-B-Domäne. Die geringen

inhibitorischen Effekte durch die Überexpression der PAS-B-Domänen von NCoA-1 und NCoA-3 könnten auf die differentielle Rekrutierung von NCoA-Proteinen zu spezifischen Promotoren zurückzuführen sein. Der Promotor des Luziferase-Reportergens kann daher ein zu künstliches System darstellen, zu dem andere Koaktivator-Komplexe rekrutiert werden bzw. zu dem nur ein NCoA-Protein rekrutiert wird, im Gegensatz zu spezifischen Promotoren eines natürlichen Zielgenes, wie z.B. dem Promotor von EBAG9 (Zhang et al., 2004b). Es könnte daher sein, dass beim Luziferase-Reportergen-Promotor nicht zwei NCoA-Proteine rekrutiert werden bzw. dass die Rekrutierung des zweiten NCoA-Proteines nicht auf eine Interaktion der PAS-B-Domäne und der CID/AD1 beruht, sondern auf einem anderen Mechanismus (z.B. über einen weiteren Koaktivator). Aus diesem Grund war es notwendig die Wirkung der Fragmente auf die hormonabhängige Expression eines natürlichen Zielgenes zu untersuchen. Die Untersuchung eines natürlichen Zielgenes des Östrogen-Rezeptors (EBAG9 oder pS2) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen, da eine Induktion dieser Zielgene in den verwendeten Zelllinien (T47D und MCF7) nicht erreicht wurde (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das Androgen-Rezeptor-Zielgen PSA (Prostate specific antigen) in der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LnCap ausgewählt, da die Rekrutierung von NCoA-Protein-Paaren zum PSA-Promotor in vorhergehenden Studien postuliert worden war (Zhang et al., 2004b). Es zeigten sich für die beiden PAS-B-Domänen unterschiedliche Effekte. Während die Überexpression der NCoA-1-PAS-B-Domäne zu einer verstärkten Transkriptionsaktivierung führte, resultierte die Überexpression der PAS-B-Domäne von NCoA-3 in einer verminderten Transkriptionsaktivierung (Abb. 3.19). Diese unterschiedliche Wirkung einer Überexpression der PAS-B-Domänen-Fragmente könnte zum einen auf den verschiedenen Bindungsspezifitäten und Motiven von NCoA-1 und NCoA-3 beruhen, die in den vorherigen Abschnitten postuliert wurden. So könnte die Überexpression der NCoA-1-PAS-B-Domäne die Rekrutierung anderer bzw. stärkerer Koaktivatoren ermöglichen und daher zu einer verstärkten Transkriptionsaktivierung führen. Die PAS-B-Domäne von NCoA-3 könnte hingegen die Rekrutierung des zweiten NCoA-Proteines zum Promotor inhibieren und daher zur verminderten Transkriptionsaktivierung führen. Diesen inhibitorischen Einfluss der NCoA-3-PAS-B-Domäne könnten Chromatin-

Immunopräzipitations-Experimente bestätigen, die eine Korekrutierung von NCoA-3 und NCoA-1 bzw. NCoA-3 und NCoA-2 zum PSA-Promotor gezeigt hatten (Zhang et al., 2004b). Damit würde die Vermutung gestützt, dass NCoA-3 bei der Expression von PSA eine wichtigere Rolle einnimmt, als die anderen beiden NCoA-Proteine.

Es konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die Überexpression von PAS-B-Domänen einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung durch nukleäre Hormonrezeptoren hat und die Expression eines natürlichen Zielgenes beeinträchtigen kann. Dies gilt wahrscheinlich ebenso für andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. STAT6, bei denen NCoA-Proteine eine wesentliche Funktion bei der Transkriptionsaktivierung besitzen. Die Wirkung der Überexpression eines NCoA-Proteines hängt im Wesentlichen davon ab, welche Koaktivatoren bzw. Koaktivator-Komplexe zu den entsprechenden Promotor-Regionen rekrutiert werden. Somit kann sich die Überexpression, je nach der Zusammensetzung des Koaktivator-Komplexes, zelltyp-, promotor- oder ligandenspezifisch vermindern oder verstärkend auf die Transkription eines Zielgenes auswirken. Ferner tragen die unterschiedlichen Affinitäten und Bindungsspezifitäten der drei NCoA-Familienmitglieder untereinander dazu bei, dass die Überexpression eines bestimmten NCoA-Proteines eine spezifische Wirkung auf die Transkriptionsaktivierung eines Zielgenes, im Vergleich zu den anderen NCoA-Familienmitgliedern, zeigt. Diese Effekte beschränken sich allerdings nicht nur auf die Interaktion zwischen zwei NCoA-Proteinen, sondern betreffen auch die Bindung der CID/AD1 zu p300/CBP und der PAS-B-Domänen zu anderen Koaktivatoren wie CoCoA.

Die Untersuchung der verschiedenartigen Interaktionen und der Regulationsmechanismen, die die Zusammensetzung der Koaktivator-Komplexe beeinflussen, sind entscheidend für das Verständnis der Transkriptionsregulation. Daher können die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse dazu beitragen, den dynamischen Ablauf der spezifischen Rekrutierung von Koaktivatoren und der Dissoziation von Koaktivator-Komplexen, die zur Regulation der Genexpression führen, weiter aufzuklären. In weiterführenden Untersuchungen ist es notwendig, den Einfluss sekundärer Modifikationen auf die Regulation der Rekrutierung und der Dissoziation von Koaktivatoren zu analysieren.

5. Zusammenfassung

Die Mitglieder der NCoA-Koaktivator-Familie fungieren als Koaktivatoren für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. nukleäre Hormonrezeptoren und STAT-Proteine. NCoA-Proteine rekrutieren sekundäre Koaktivatoren, die durch die Modifikation des Chromatins die Transkriptionsaktivierung ermöglichen. Vorhergehende Studien postulierten die Dimerisierung von NCoA-Proteinen über die aminoterminalen bHLH/PAS-Domänen und die Rekrutierung von Paaren von NCoA-Proteinen, konnten jedoch eine direkte Interaktion nicht nachweisen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die PAS-B-Domäne von NCoA-1 ein LXXLL-Motiv in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 binden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Interaktion von Mitgliedern der NCoA-Proteinfamilie über die PAS-B-Domäne und eigene LXXLL-Motive vermittelt werden kann und welche physiologische Bedeutung die Interaktion von NCoA-Proteinen hat. Die Interaktion endogener NCoA-Proteine konnte in zwei verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die PAS-B-Domänen aller drei NCoA-Familienmitglieder mit allen Vollängen-NCoA-Proteinen interagieren können und für eine solche Interaktion ausreichend sind. Dabei interagieren die PAS-B-Domänen spezifisch mit einer Region in der CBP-Interaktions-Domäne (CID/AD1) von NCoA-1, die zwei LXXLL-Motive und den vollständigen Bereich, der die Interaktion mit CBP vermittelt, enthält. Es zeigte sich, dass sich die Bindungsmotivspezifität der NCoA-1-PAS-B-Domäne von den Bindungsmotivspezifitäten der PAS-B-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 unterscheidet. Ebenso zeigten sich unterschiedliche Bindungsmotivspezifitäten für die Interaktion mit der CID/AD1 von NCoA-3, die nur mit der PAS-B-Domäne von NCoA-1 interagierte. Eine physiologische Bedeutung der charakterisierten PAS-B/CID/AD1-Interaktion auf die Bildung und Rekrutierung von Koaktivator-Komplexen wurde mittels Überexpressions-Experimenten untersucht, in denen dominant negative Effekte erwartet wurden. So führte die Überexpression der PAS-B-Domäne bzw. die Konkurrenz mit der CID/AD1 zur Inhibition der Interaktion von NCoA-1 mit dem Koaktivator CBP und dem Transkriptionsfaktor STAT6. Außerdem führte die stabile Überexpression der PAS-B-Domänen von

NCoA-1 und NCoA-3 zu einer veränderten Expression des natürlichen endogenen Androgen-Rezeptor-Zielgenes PSA. Die in dieser Arbeit identifizierte Interaktion von NCoA-Proteinen stellt einen neuen und, zu den bisher bekannten Modellen der Koaktivator-Rekrutierung, ergänzenden Mechanismus dar. Dies gilt sowohl für eine postulierte inter- und intramolekulare Interaktion von NCoA-1 bei der STAT6-vermittelten Transkriptionsaktivierung, als auch für die durch nukleäre Hormonrezeptoren geforderte Rekrutierung von Paaren von NCoA-Proteinen.

Zusammenfassend können die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse dabei helfen, das Verständnis der dynamischen Rekrutierung von Koaktivatoren bzw. Koaktivator-Komplexen und damit der Regulation der Genexpression, weiter zu verbessern.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACTR	Activator of thyroid and retinoic acid receptors
AD2	Aktivierungsdomäne 2
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AIB1	Amplified in breast cancer 1
ANCO-1	Ankyrin repeats containing cofactor-1
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BAF57	BRG1-associated factor 57
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
BSA	Rinderserumalbumin
CARM1	Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1
CBP	cAMP-responsive element-binding protein-binding protein
cDNA	complementary DNA
CFP	Cyan fluorescent protein
CID/AD1	CBP-Interaktions-Domäne/Aktivierungsdomäne 1
CoCoA	Coiled-coil coactivator
cpm	counts per minute
CREB	cAMP response element-binding-protein
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	17 β -Östradiol
ECFP	Enhanced Cyan fluorescent protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Östrogen-Rezeptor
EYFP	Enhanced Yellow fluorescent protein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
Fli-I	Flightless I
g	relative Erdbeschleunigung
GAC63	GRIP1-associated coactivator 63
GFP	Green fluorescent protein
GRIP1	Glucocorticoid receptor-interacting protein 1
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α

hMMS 19	human methyl methanesulfonate 19
HMT	Histon-Methyltransferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IRES	Internal ribosomal entry site
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Mol
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCoA	Nuclear receptor coactivator
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NID	Nuclear-Receptor-Interaction-Domäne
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optische Dichte
p/CAF	p300/CBP-associated factor
p/CIP	p300/CBP/co-integrator-associated protein
PAS	Per/ARNT/Sim
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PER	Period gene protein
PRMT1	Protein Arginine Methyltransferase 1
PSA	Prostate specific antigen
RAC3	Receptor-associated coactivator 3
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RU	Response Units
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	Single-minded gene product
SRC	Steroid receptor coactivator
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBST	Tris buffered saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TIF2	Transcriptional intermediary factor 2
TRAM-1	Thyroid hormone receptor activator molecule-1
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western-Blot
YFP	Yellow fluorescent protein

7. Literaturverzeichnis

Agoulnik, I. U., Vaid, A., Bingman, W. E., 3rd, Erdeme, H., Frolov, A., Smith, C. L., Ayala, G., Ittmann, M. M. and Weigel, N. L. (2005). Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res*, 65, 7959-7967.

Agoulnik, I. U., Vaid, A., Nakka, M., Alvarado, M., Bingman, W. E., 3rd, Erdem, H., Frolov, A., Smith, C. L., Ayala, G. E., Ittmann, M. M. and Weigel, N. L. (2006). Androgens Modulate Expression of Transcription Intermediary Factor 2, an Androgen Receptor Coactivator whose Expression Level Correlates with Early Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 66, 10594-10602.

Ali, S., Metzger, D., Bornert, J. M. and Chambon, P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *Embo J*, 12, 1153-1160.

Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277, 965-968.

Apostolakis, E. M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Onate, S. and O'Malley, B. W. (2002). Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol Endocrinol*, 16, 1511-1523.

Aranda, A. and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-1304.

Arimura, A., vn Peer, M., Schroder, A. J. and Rothman, P. B. (2004). The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J Biol Chem*, 279, 31105-31112.

Auger, A. P., Tetel, M. J. and McCarthy, M. M. (2000). Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7551-7555.

Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D. and Miura, M. T. (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol*, 69, 201-220.

Baus, D. and Pfitzner, E. (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer*, 118, 1404-1413.

Bautista, S., Valles, H., Walker, R. L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P. and Theillet, C. (1998). In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res*, 4, 2925-2929.

Beischlag, T. V., Wang, S., Rose, D. W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., Nelson, W. E., Probst, M. R., Rosenfeld, M. G. and Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol*, 22, 4319-4333.

Belandia, B., Orford, R. L., Hurst, H. C. and Parker, M. G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *Embo J*, 21, 4094-4103.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, 100, 243-255.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

- Bromberg, J. F. (2001). Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23, 161-169.
- Carapeti, M., Aguiar, R. C., Goldman, J. M. and Cross, N. C. (1998). A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood*, 91, 3127-3133.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 20, 402-415.
- Carroll, R. S., Brown, M., Zhang, J., DiRenzo, J., Font De Mora, J. and Black, P. M. (2000). Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res*, 6, 3570-3575.
- Chauchereau, A., Amazit, L., Quesne, M., Guiochon-Mantel, A. and Milgrom, E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem*, 278, 12335-12343.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, 90, 569-580.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W. and Stallcup, M. R. (1999a). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, 284, 2174-2177.
- Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R. M. (1999b). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, 98, 675-686.
- Chen, D., Huang, S. M. and Stallcup, M. R. (2000). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300 [In Process Citation]. *J Biol Chem*, 275, 40810-40816
- Chen, Y. H., Kim, J. H. and Stallcup, M. R. (2005). GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol*, 25, 5965-5972.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D. and Vandiel, L. (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *Embo J*, 21, 5457-5466.
- Coulthard, V. H., Matsuda, S. and Heery, D. M. (2003). An extended LXXLL motif sequence determines the nuclear receptor binding specificity of TRAP220. *J Biol Chem*, 278, 10942-10951.
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletcher, R. J. and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*, 12, 3343-3356.
- Demarest, S. J., Martinez-Yamout, M., Chung, J., Chen, H., Xu, W., Dyson, H. J., Evans, R. M. and Wright, P. E. (2002). Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature*, 415, 549-553.
- Dilworth, F. J. and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*, 20, 3047-3054.

Ding, X. F., Anderson, C. M., Ma, H., Hong, H., Uht, R. M., Kushner, P. J. and Stallcup, M. R. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol*, 12, 302-313.

Feng, Q., Yi, P., Wong, J. and O'Malley, B. W. (2006). Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol*, 26, 7846-7857.

Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. and Malim, M. H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *Embo J*, 16, 4531-4539.

Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (2002). The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*, 22, 5923-5937.

Ghadimi, B. M., Schrock, E., Walker, R. L., Wangsa, D., Jauho, A., Meltzer, P. S. and Ried, T. (1999). Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol*, 154, 525-536.

Glaeser, M., Floetotto, T., Hanstein, B., Beckmann, M. W. and Niederacher, D. (2001). Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm Metab Res*, 33, 121-126.

Gnanapragasam, V. J., Leung, H. Y., Pulimood, A. S., Neal, D. E. and Robson, C. N. (2001). Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br J Cancer*, 85, 1928-1936.

Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54, 536-539.

Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S. and Wilson, E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*, 61, 4315-4319.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 519-561.

Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 394-403.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 465-503.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors [see comments]. *Nature*, 387, 733-736.

Heery, D. M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M. G. and Sheppard, H. (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem*, 276, 6695-6702.

Henke, R. T., Haddad, B. R., Kim, S. E., Rone, J. D., Mani, A., Jessup, J. M., Wellstein, A., Maitra, A. and Riegel, A. T. (2004). Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 6134-6142.

- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. and Stallcup, M. R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4948-4952.
- Hsing, A. W., Chokkalingam, A. P., Gao, Y. T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Cheng, J., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., Chiang, T., Chen, Y. L., Stanczyk, F. Z. and Chang, C. (2002). Polymorphic CAG/CAA repeat length in the AIB1/SRC-3 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11, 337-341.
- Huang, Z. J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, 364, 259-262.
- Irvine, R. A., Ma, H., Yu, M. C., Ross, R. K., Stallcup, M. R. and Coetzee, G. A. (2000). Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet*, 9, 267-274.
- Kalkhoven, E., Valentine, J. E., Heery, D. M. and Parker, M. G. (1998). Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *Embo J*, 17, 232-243.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L. and Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 189-204.
- Kim, J. H., Li, H. and Stallcup, M. R. (2003). CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators. *Mol Cell*, 12, 1537-1549.
- Kino, T., Slobodskaya, O., Pavlakis, G. N. and Chrousos, G. P. (2002). Nuclear receptor coactivator p160 proteins enhance the HIV-1 long terminal repeat promoter by bridging promoter-bound factors and the Tat-P-TEFb complex. *J Biol Chem*, 277, 2396-2405.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. and Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285, 1-24.
- Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H. and Stallcup, M. R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, 276, 1089-1098.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, 279, 703-707.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. (2002). The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem*, 277, 30283-30288.
- Kumar, M. B. and Perdew, G. H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr*, 8, 273-286.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, S. K., Kim, H. J., Na, S. Y., Kim, T. S., Choi, H. S., Im, S. Y. and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, 273, 16651-16654.
- Lee, T. I. and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, 34, 77-137.

- Lee, Y. H., Koh, S. S., Zhang, X., Cheng, X. and Stallcup, M. R. (2002). Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, 22, 3621-3632.
- Lee, Y. H., Campbell, H. D. and Stallcup, M. R. (2004). Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol*, 24, 2103-2117.
- Leers, J., Treuter, E. and Gustafsson, J. A. (1998). Mechanistic principles in NR box-dependent interaction between nuclear hormone receptors and the coactivator TIF2. *Mol Cell Biol*, 18, 6001-6013.
- Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651-662.
- Li, H., Gomes, P. J. and Chen, J. D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8479-8484.
- Li, J., O'Malley, B. W. and Wong, J. (2000). p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol Cell Biol*, 20, 2031-2042.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2003). Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol*, 23, 3763-3773.
- Li, A. J., Lerner, D. L., Gapuzan, M. E. and Karlan, B. Y. (2005). AIB1 polymorphisms predict aggressive ovarian cancer phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 2919-2922.
- Liang, J., Prouty, L., Williams, B. J., Dayton, M. A. and Blanchard, K. L. (1998). Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood*, 92, 2118-2122.
- Lindebro, M. C., Poellinger, L. and Whitelaw, M. L. (1995). Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *Embo J*, 14, 3528-3539.
- List, H. J., Reiter, R., Singh, B., Wellstein, A. and Riegel, A. T. (2001). Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, 68, 21-28.
- Litterst, C. M. and Pfitzner, E. (2001). Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J Biol Chem*, 276, 45713-45721.
- Litterst, C. M. and Pfitzner, E. (2002). An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem*, 277, 36052-36060.
- Litterst, C. M., Kliem, S., Marilley, D. and Pfitzner, E. (2003). NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *J Biol Chem*, 278, 45340-45351.
- Liu, P. Y., Hsieh, T. Y., Chou, W. Y. and Huang, S. M. (2006). Modulation of glucocorticoid receptor-interacting protein 1 (GRIP1) transactivation and co-activation activities through its C-terminal repression and self-association domains. *Febs J*, 273, 2172-2183.
- Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. (2005). Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci*, 30, 126-132.
- Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. (2006). The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*, 125, 411-414.

- Lopez, G. N., Turck, C. W., Schaufele, F., Stallcup, M. R. and Kushner, P. J. (2001). Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem*, 276, 22177-22182.
- Ma, H., Hong, H., Huang, S. M., Irvine, R. A., Webb, P., Kushner, P. J., Coetzee, G. A. and Stallcup, M. R. (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol*, 19, 6164-6173.
- Mak, H. Y., Hoare, S., Henttu, P. M. and Parker, M. G. (1999). Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Mol Cell Biol*, 19, 3895-3903.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83, 835-839.
- McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev*, 12, 3357-3368.
- McKenna, N. J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11697-11702.
- McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69, 3-12.
- McKenna, N. J. and O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108, 465-474.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115, 751-763.
- Na, S. Y., Lee, S. K., Han, S. J., Choi, H. S., Im, S. Y. and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, 273, 10831-10834.
- Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M. T. and Torchia, J. (2007). The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol*, 27, 120-134.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T. (1991). The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67, 1157-1167.
- Needham, M., Raines, S., McPheat, J., Stacey, C., Ellston, J., Hoare, S. and Parker, M. (2000). Differential interaction of steroid hormone receptors with LXXLL motifs in SRC-1a depends on residues flanking the motif. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72, 35-46.
- Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-143.
- Northrop, J. P., Nguyen, D., Piplani, S., Olivan, S. E., Kwan, S. T., Go, N. F., Hart, C. P. and Schatz, P. J. (2000). Selection of estrogen receptor beta- and thyroid hormone receptor beta-specific coactivator-mimetic peptides using recombinant peptide libraries. *Mol Endocrinol*, 14, 605-622.
- Novac, N. and Heinzl, T. (2004). Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3, 335-346.

- Numayama-Tsuruta, K., Kobayashi, A., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A point mutation responsible for defective function of the aryl-hydrocarbon-receptor nuclear translocator in mutant Hepa-1c1c7 cells. *Eur J Biochem*, 246, 486-495.
- O'Nate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, 270, 1354-1357.
- O'Shea, J. J., Gadina, M. and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109 Suppl, S121-131.
- Pellequer, J. L., Wager-Smith, K. A., Kay, S. A. and Getzoff, E. D. (1998). Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5884-5890.
- Perissi, V. and Rosenfeld, M. G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 542-554.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M. F., O'Malley, B. W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, 111, 931-941.
- Plevin, M. J., Mills, M. M. and Ikura, M. (2005). The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 30, 66-69.
- Pongratz, I., Antonsson, C., Whitelaw, M. L. and Poellinger, L. (1998). Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 18, 4079-4088.
- Razeto, A., Ramakrishnan, V., Litterst, C. M., Giller, K., Griesinger, C., Carlomagno, T., Lakomek, N., Heimbürg, T., Lodrini, M., Pfizner, E. and Becker, S. (2004). Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain. *J Mol Biol*, 336, 319-329.
- Reese, J. C. (2003). Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 114-118.
- Reid, G., Hubner, M. R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell*, 11, 695-707.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M. R., Fukunaga, B. N. and Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol*, 14, 6075-6086.
- Reiter, R., Wellstein, A. and Riegel, A. T. (2001). An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem*, 276, 39736-39741.
- Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 21, 327-335.
- Rollerova, E. and Urbancikova, M. (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review). *Endocr Regul*, 34, 203-218.
- Rowan, B. G., Weigel, N. L. and O'Malley, B. W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 275, 4475-4483.

- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Kimura, A., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T. and Yamagishi, H. (2000). Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer*, 89, 217-223.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schindler, C. W. (2002). Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*, 109, 1133-1137.
- Schnell, T., Foley, P., Wirth, M., Munch, J. and Uberla, K. (2000). Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther*, 11, 439-447.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A. and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103, 843-852.
- Shang, Y. and Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, 295, 2465-2468.
- Shang, Y., Myers, M. and Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*, 9, 601-610.
- Sheppard, K. A., Phelps, K. M., Williams, A. J., Thanos, D., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Gerritsen, M. E. and Collins, T. (1998). Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*, 273, 29291-29294.
- Sheppard, H. M., Harries, J. C., Hussain, S., Bevan, C. and Heery, D. M. (2001). Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1 [In Process Citation]. *Mol Cell Biol*, 21, 39-50.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67, 31-40.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198.
- Suen, C. S., Berrodin, T. J., Mastroeni, R., Cheskis, B. J., Lyttle, C. R. and Frail, D. E. (1998). A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, 273, 27645-27653.
- Sun, W., Zhang, J. and Hankinson, O. (1997). A mutation in the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in a cultured mammalian cell line identifies a novel region of AHR that affects DNA binding. *J Biol Chem*, 272, 31845-31854.
- Takeshita, A., Yen, P. M., Misiti, S., Cardona, G. R., Liu, Y. and Chin, W. W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, 137, 3594-3597.
- Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S. and Chin, W. W. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*, 272, 27629-27634.
- Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J. and Kato, S. (1999). Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol Cell Biol*, 19, 1049-1055.

- Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A. and Isola, J. J. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 1833-1839.
- Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 479-506.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function [see comments]. *Nature*, 387, 677-684.
- Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63, 451-486.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J*, 15, 3667-3675.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J*, 17, 507-519.
- Vreede, J., van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielaard, W. and van Aalten, D. M. (2003). PAS domains. Common structure and common flexibility. *J Biol Chem*, 278, 18434-18439.
- Wachtel, M., Dettling, M., Koscielniak, E., Stegmaier, S., Treuner, J., Simon-Klingenstein, K., Buhlmann, P., Niggli, F. K. and Schafer, B. W. (2004). Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res*, 64, 5539-5545.
- Wakao, H., Gouilleux, F. and Groner, B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *Embo J*, 13, 2182-2191.
- Wang, Z., Rose, D. W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000). Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13549-13554.
- Wang, Y., Wu, M. C., Sham, J. S., Zhang, W., Wu, W. Q. and Guan, X. Y. (2002). Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*, 95, 2346-2352.
- Wang, Q., Carroll, J. S. and Brown, M. (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol Cell*, 19, 631-642.
- Wang, Z., Qi, C., Krones, A., Woodring, P., Zhu, X., Reddy, J. K., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G. and Hunter, T. (2006). Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance. *Cell Metab*, 3, 111-122.
- Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M. P., Chen, D., Huang, S. M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Stallcup, M. R. and Kushner, P. J. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*, 12, 1605-1618.
- Weiss, R. E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B. W. and Refetoff, S. (1999). Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J*, 18, 1900-1904.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. and Costas, M. A. (2000). RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett*, 485, 195-199.

- Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R. T., Wisely, G. B., McInerney, E. M., Rose, D. W., Milburn, M. V., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (1998). Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature*, 395, 199-202.
- Woychik, N. A. and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108, 453-463.
- Wu, X., Li, H. and Chen, J. D. (2001). The human homologue of the yeast DNA repair and TFIIH regulator MMS19 is an AF-1-specific coactivator of estrogen receptor. *J Biol Chem*, 276, 23962-23968.
- Wu, R. C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2002). Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*, 22, 3549-3561.
- Wu, R. C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2004). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*, 15, 937-949.
- Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Shi, B., Li, R., Wang, Y., Liang, J., Fan, D., Wu, G., Wang, D., Li, S. and Shang, Y. (2006). Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. *J Biol Chem*, 281, 21848-21856.
- Xie, D., Sham, J. S., Zeng, W. F., Lin, H. L., Bi, J., Che, L. H., Hu, L., Zeng, Y. X. and Guan, X. Y. (2005). Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, 36, 777-783.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, 279, 1922-1925.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B. W. (2000). The steroid receptor coactivator SRC-3 (pCIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6379-6384.
- Xu, J. and O'Malley, B. W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*, 3, 185-192.
- Xu, J. and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol*, 17, 1681-1692.
- Yanase, T., Adachi, M., Goto, K., Takayanagi, R. and Nawata, H. (2004). Coregulator-related diseases. *Intern Med*, 43, 368-373.
- Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. and Livingston, D. M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10626-10631.
- Zhang, A., Yeung, P. L., Li, C. W., Tsai, S. C., Dinh, G. K., Wu, X., Li, H. and Chen, J. D. (2004a). Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*, 279, 33799-33805.
- Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Yin, N., Shi, B., Wu, H., Wang, D., Wu, G. and Shang, Y. (2004b). Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes Dev*, 18, 1753-1765.
- Zhou, H. J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S. H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S. Y. and Tsai, M. J. (2005). SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*, 65, 7976-7983.

Zor, T., De Guzman, R. N., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2004). Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of c-Myb. *J Mol Biol*, 337, 521-534.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Marco Lodrini
Diplom-Biologe
Nelkenstraße 28
63263 Neu-Isenburg

Geburtsdatum: 25.10.1974
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch und italienisch

Schulische und universitäre Ausbildung

1981-1985	Albert-Schweitzer-Grundschule in Neu-Isenburg
1985-1987	Förderstufe, Buchenbusch-Schule in Neu-Isenburg
1987-1994	Goethe-Gymnasium in Neu-Isenburg, Abschluss Abitur
1995-1996	Zivildienst
1996 – 2002	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main; Abschluss Diplom
11/1999-12/1999	studentische Hilfskraft beim Teilprojekt STP B5 im Rahmen des SFB 474 im Zoologischen Institut, AK Kinematische Zellforschung bei Prof. Dr. Bereiter-Hahn

03/2001 – 02/2002	Diplom-Arbeit am Institut für Mikrobiologie über das Thema „Proteomanalysen mit halophilen Archaea“ bei Prof. Dr. Soppa
03/2002 – 06/2002	Industrie-Praktikum bei Aventis Pharma Deutschland GmbH in den Abteilungen DI&A Cardiovascular und Functional Genomics bei Dr. Caroline Blumer
seit 07/2002	Promotion am Georg-Speyer-Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Frankfurt am Main, in der Arbeitsgruppe von Dr. Edith Pfitzner unter der Betreuung von Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

8.2 Veröffentlichungen

Razeto, A., Ramakrishnan, V., Litterst, C. M., Giller, K., Griesinger, C., Carlomagno, T., Lakomek, N., Heimbürg, T., Lodrini, M., Pfitzner, E. and Becker, S. (2004). Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain. *J Mol Biol*, 336, 319-329.

Litterst, C. M., Kliem, S., Lodrini, M. and Pfitzner, E. (2005). Coactivators in gene regulation by STAT5. *Vitam Horm*, 70, 359-386. Review.

Lodrini, M. and Pfitzner, E.. Specific interactions between the PAS-B domain and the CBP-interaction domain of p160/SRC/NCoA proteins mediate coactivator recruitment and transcriptional regulation. *In Vorbereitung*.

8.3 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau Dr. Edith Pfitzner für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die Möglichkeit diese Arbeit in ihrem Labor durchführen zu können. Besonders bedanken möchte ich mich für ihre Betreuung und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Prof. Dr. Groner für die Möglichkeit meine Promotion im Georg-Speyer-Haus vollenden zu können.

Ich danke den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pfitzner, nämlich Sinje, Stefanie, Tobias, Frank, Anes, Claudia F., Sandra K., Claudia L., Frauke, Sandra B. und Philipp für ein gutes Arbeitsklima und eine hervorragende Zusammenarbeit. Ganz besonders danke ich Daniela für ihre Unterstützung, die aufmunternden Worte und die hilfreichen Vorschläge beim Verfassen dieser Arbeit. Ich bedanke mich auch bei allen Kollegen im Georg-Speyer-Haus für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft, insbesondere bei unseren früheren „Nachbarn“ der Arbeitsgruppe Schnierle (Alexandra, Katja, Melanie, Thomas und Barbara), bei Benjamin für seine Hilfe bei den Gelfiltrationsversuchen, bei Klaus Lehmen für seine Unterstützung bei allen möglichen Computer-Problemen und bei Herbert Kühnel für seine Unterstützung bei allen Fragen der Sicherheit im Labor.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Stefan Becker vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen für die Bereitstellung verschiedener Plasmide und Arbeitsprotokolle, sowie die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei allen meinen Freunden außerhalb des Labors und meinen Eltern, die mich seelisch unterstützt haben und ohne deren Beitrag mein Studium und diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.