

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

**Der Einfluss von Struktur- und Proteinwechselwirkungen
auf die Funktion von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel von BAG-1M und
HspBP1 sowie Mutationen der Ligandenbindungsdomäne**

Regina Theresia Maria-Anna Knapp

aus

Traunstein

2009

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28.10.2009

Regina Knapp

Dissertation eingereicht am: 28.10.2009

1. Gutachter: Prof. F. Holsboer

2. Gutachter: Prof. H. Zorbas

Mündliche Prüfung am: 28.04.2010

Für Sigrid

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Florian Holsboer und unter der Betreuung von Dr. Theo Rein am Max-Planck-Institut für Psychiatrie angefertigt.

Ich möchte mich sehr herzlich bei **Prof. Florian Holsboer** bedanken, der mir die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglicht hat. Die Arbeit in diesem anregenden wissenschaftlichen Umfeld war eine Bereicherung und eine sehr interessante Erfahrung.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei **Prof. Haralabos Zorbas** dafür, dass er meine Arbeit an der LMU vertreten hat.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Theo Rein** für die bestmögliche wissenschaftliche Betreuung, seine Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und seine unerschütterliche Ruhe.

Vielen herzlichen Dank an **Dr. Andreas Bracher** für die Strukturanalysen, seine Zeit und sein Engagement das er in „Flora“ investierte, bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei **Prof. Chris Turck, Dr. Giuseppina Maccarrone** und **Christiane Rewerts** für die massenspektrometrischen Analysen.

Dr. Felix Hausch und **Dr. Christian Kozany** danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit bei der Etablierung der Polarisationsexperimente und für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei **Dr. Gabriela Wochnik** und **Dr. Ulrike Schmidt** bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei **Dr. Jürgen Zschocke** für seine Zeit zum Korrekturlesen, für wissenschaftliche Gespräche, für seinen Führungsstil (Tango, Salsa etc.) und meine ersten Erfahrungen im Klettern bedanken.

Kathi danke ich sehr herzlich für ihr Organisationstalent im Labor und für ihre Hilfe bei diversen Experimenten.

Meinen Kollegen, **Bärbel, Nicki, Vanessa, Nils, Jan, Tatjana, Ludwig** und **Nele** danke ich sehr für das inspirierende Arbeitsklima und ihre Kameradschaft innerhalb und außerhalb des Labors.

Den Kollegen vom **technischen Dienst** und der **EDV** möchte ich sehr herzlich für ihre Arbeit danken. Durch die Reparatur und Wartung wissenschaftlicher Geräte wie z. B. Brutschränke, Luminometer etc. trugen sie ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Meiner **Mutter** und **meinen Freunden**, ganz besonders **Stefan, Xandi, Armin** und **Maria** möchte ich an dieser Stelle für ihre moralische Unterstützung und für ihre Freundschaft danken, die mich seit Beginn meines Studiums und länger begleitet.

Inhaltsverzeichnis	I-IV
Abkürzungen	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Was ist Stress?.....	1
1.2 Die HPA-Achse	1
1.3 Veränderungen der HPA-Achsen Aktivität bei depressiver Störung	3
1.4 Die Hypothese des MR/GR-Gleichgewichts.....	4
1.5 Aufbau und strukturelle Domänen von Steroidhormonrezeptoren der Klasse I	6
1.6 Signaltransduktion durch Steroidhormonrezeptoren.....	9
1.7 Faltungszyklus der Steroidhormonrezeptoren.....	10
1.8 BAG-1M und HspBP1: alternative Hsc70/Hsp70-NEF.....	12
1.8.1 Bcl2-assoziiertes Athanogen 1: BAG-1	12
1.8.2 Hsp70-bindendes Protein 1: HspBP1	16
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2 MATERIAL	19
2.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	19
2.2 Verbrauchsmaterial.....	22
2.3 Enzyme	22
2.3.1 Restriktionsendonucleasen	22
2.3.2 DNA-Polymerasen	23
2.3.3 Sonstige Enzyme	23
2.4 Marker	23
2.5 Antikörper.....	24
2.6 Zelllinien und Bakterienstämme.....	25
2.6.1 Zelllinien.....	25
2.6.2 Bakterienstämme	25
2.7 Allgemeine Plasmide.....	26
2.8 Klonierte Plasmide	27
2.9 Primer	29

2.10	Kits, Geräte, Apparaturen und Software	31
2.10.1	Kits	31
2.10.2	Geräte und Apparaturen	32
2.10.3	Software.....	33
3	METHODEN	34
3.1	Zellkultur	34
3.1.1	Kultivierung von Säugetierzellen	34
3.1.2	Dauerhafte Lagerung und Inkulturnahme	34
3.1.3	Herstellung von steroidfreiem FBS	35
3.1.4	Herstellung von Trypsin und PBS	35
3.1.5	Mycoplasmentest.....	36
3.1.6	Transfektion von Säugetierzellen	37
3.1.7	Reportergen-Experimente.....	39
3.2	Mikrobiologische Standardmethoden.....	42
3.2.1	Herstellung von Nährmedien und Agar-Platten	42
3.2.2	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	42
3.2.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	43
3.2.4	Hitzeschock Transformation von <i>E. coli</i>	43
3.3	DNA-Analytik	44
3.3.1	Plasmidpräparation	44
3.3.2	DNA-Fällung mit Natriumacetat.....	45
3.3.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	46
3.3.4	Isolierung von mRNA aus Säugetierzellen mit TRIZOL.....	46
3.3.5	Reverse Transkription	47
3.3.6	Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion	47
3.3.7	Enzymatische Spaltung von DNA.....	53
3.3.8	Enzymatische Ligation	53
3.3.9	DNA-Agarosegel-Elektrophorese	54
3.3.10	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel.....	54
3.3.11	Reinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR-Reinigungs-Kit.....	55
3.4	Proteinbiochemische Methoden	55

3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	55
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
3.4.3	Kolloidal Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	58
3.4.4	Westernblot-Analyse:	59
3.4.5	Färbung von Nitrozellulose-Membranen mit Amidoschwarz	61
3.4.6	Protein-Protein Co-Immunpräzipitation.....	61
3.4.7	Quantifizierung der Westernblots und Coomassie-Gele	63
3.4.8	Polarisationsexperiment: Hormonbindungsanalyse	64
3.4.9	Bestimmung der Menge an hormonbindungsfähigem Rezeptor mit [³ H]-Kortikosteron	66
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Einfluss von BAG-1M auf den Progesteronrezeptor (PR): Funktions- und Interaktionsanalyse	67
4.1.1	Inhibition der Aktivität des Progesteronrezeptors durch BAG-1M	67
4.1.2	Hsc70/Hsp70-vermittelte Interaktion des Progesteronrezeptors mit BAG-1M	69
4.1.3	Herstellung verschiedener Progesteronrezeptor-Mutanten	71
4.1.4	Funktionelle Analyse der Progesteronrezeptor-Mutanten.....	73
4.1.5	Interaktionsprofil von BAG-1M mit den PR-Mutanten – fehlende Interaktion mit PR_DBD.....	75
4.1.6	Verlust der Hsc70/Hsp70-Bindung an PR_DBD	79
4.2	Vergleich von BAG-1M und HspBP1 bezüglich Ihrer Wirkung auf Funktion und Interaktion mit verschiedenen Steroidhormonrezeptoren und faltungsrelevanten Cofaktoren	82
4.2.1	Strategien zur Untersuchung der mechanistischen Grundlagen der Wirkung von BAG- 1M und HspBP1	83
4.2.2	Rpt4 und Rpt6: Hsc70/Hsp70-unabhängige Interaktoren von BAG-1M.....	84
4.2.3	Verifizierung der Interaktion von Rpt4 und Rpt6 mit BAG-1M.....	85
4.2.4	Kein Verlust der Rezeptorbindung nach Deletion der <i>ubiquitin-like</i> Domäne in BAG- 1M	87
4.2.5	Funktionelle Analyse des Einflusses von HspBP1 auf verschiedene Steroidhormonrezeptoren im Vergleich mit BAG-1M.....	89
4.2.6	Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Komposition der Chaperon-Rezeptor- Heterokomplexe	101

4.2.7	Etablierung eines zeitabhängigen Hormonbindungsexperiments in Gegenwart von BAG-1M und HspBP1	107
4.3	Design eines murinen Mineralokortikoidrezeptors mit der Hormonaffinität des Glukokortikoidrezeptors.....	120
4.3.1	Zwei Strategien: mMR-GR-LBD Chimäre und Punktmutationen in der MR-LBD ..	120
4.3.2	Funktionelle Analyse der mMR-Mutanten.....	125
5	DISKUSSION	132
5.1	Modulation der Steroidhormonrezeptor-Funktion durch assoziierte Cochaperone ...	133
5.1.1	GR und PR: verschiedene Mechanismen der Inhibition durch BAG-1M?	134
5.1.2	Funktion der <i>ubiquitin-like</i> -Domäne von BAG-1M für die Regulation der Steroidhormonrezeptoren	138
5.1.3	Der mechanistische Unterschied zwischen BAG-1M und HspBP1 in der Regulation der Steroidhormonrezeptor-Funktion	144
5.1.4	Alles eine Frage der Zeit?.....	150
5.2	Modulation der Steroidhormonrezeptor-Aktivität durch gezielte Modifikationen der MR-LBD.....	152
5.2.1	Veränderung der Hormonbindungsaffinität des mMR durch Substitution und Mutationen der LBD.....	152
5.2.2	Ein neuer Ansatz zur Überprüfung der Relevanz der MR/GR-Balance für die Stressbewältigung.....	154
6	ZUSAMMENFASSUNG	156
7	LITERATURVERZEICHNIS	158
8	ANHANG	174
	Lebenslauf	175

Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP/ATP	Adenosin-5'-Diphosphat/-Triphosphat
AF	Aktivierungsfunktion
APS	Amoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
BAG-1	Bcl2-associated athanogene 1
CMV	Cytomegalovirus
CRH	<i>corticotropin releasing hormon</i>
Δ	Zeichen für Deletion
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dex	Dexamethason
DHT	Dihydrotestosteron
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DST	Dex-Suppresions-Test
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
EtOH	Ethanol
FBS	<i>featal bovine serum</i>
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
Flag-Tag	Flag-Epitop
Fludro	Fludrokortison
g	Gramm
GRE	Glukokortikoid-responsives -Element
h	Stunde
HA-Tag	Hemagglutinin-Epitop
hGR	humaner Glukokortikoidrezeptor
Hip	<i>Hsp70-interacting protein</i>
Hop	<i>Hsp-organizing protein</i>
HPA-Achse	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
HRE	Hormon-responsives-Element
Hsc70	<i>heat shock cognate 70 kDa protein</i>
Hsp40	<i>heat shock 40 kDa protein</i>
Hsp70	<i>heat shock 70 kDa protein</i>
Hsp90	<i>heat shock 90 kDa protein</i>
HspBP1	<i>Hsp70-binding protein 1</i>
kDa	Kilo Dalton
Kort.	Kortisol oder Kortikosteron
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minuten
mMR	muriner Mineralokortikoidrezeptor
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>

NEF	<i>nucleotide exchange factor</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
p23	23 kDa protein
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-Fluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PR	Progesteronrezeptor
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SR	Steroidhormonrezeptor
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeats</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
Ubidel	Deletion der ULD
ULD	<i>ubiquitin-like domain</i>
WT	Wildtyp
x g	x Gravitationsfaktor (9,81m/s ²)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Was ist Stress?

In einer leistungsorientierten Gesellschaft mit einer stetig wachsenden Zahl an stressbedingten Krankheitsbildern prägen inzwischen Schlagworte wie „Stressmanagement“ oder „*Work-Life-Balance*“ unser allgemeines Vokabular. In Seminaren und Schulungen wird erklärt, wie man den täglichen Anforderungen von Beruf und Privatleben gerecht werden könne, und welche Verhaltensstrategien sich für die Stressbewältigung bewährt haben. Bis heute jedoch ist der Begriff Stress nicht klar definiert. Hans Selye nannte es ein „Syndrom, verursacht durch diverse schädliche Einflüsse“ (Selye, 1936), auch bekannt als „allgemeines Adaptionssyndrom“. Heute gibt es verschiedene Stresstheorien, die beschreiben, aus welchem Grund bestimmte Stressoren bestimmte körperliche Reaktionen auslösen. Gemeinhin kann Stress als Störung der Organismus-eigenen Homöostase bezeichnet werden, die als Folge veränderter Umweltbedingungen auftritt. Aus evolutionärer Sicht ist Stress und die damit verbundene Stressantwort eine wichtige Überlebensstrategie. So reagieren die meisten Tiere, nachdem eine Situation als gefährlich erkannt wurde, mit Flucht. Anfangs galten hauptsächlich physische Stressoren als ausschlaggebend für Stress, doch in der Zwischenzeit weiß man, dass vor allem psychologische Stressoren wesentlich wirksamer sein können (Heuser & Lammers, 2003). Durch Adaption auf zellulärer Ebene und im Verhalten versucht der Organismus sich an die veränderte Situation anzupassen. Um dies zu gewährleisten, entwickelte sich in Säugetieren ein fein abgestimmtes, hormonell gesteuertes Regulationssystem, das den Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde umfasst. Dieses endokrine System wird auch als hypothalamo-hypophysäre-adrenocorticale (*hypothalamic-pituitary-adrenal* = HPA) Achse bezeichnet (Abb. 1).

1.2 Die HPA-Achse

Die Reize verschiedener Stressoren gelangen über afferente Neuronen an das zentrale Nervensystem (ZNS). Wird ein Signal als „Stress“ interpretiert, sekretieren Neuronen des hypothalamischen Nucleus paraventricularis die Peptide *Corticotropin Releasing Hormon* (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP). CRH stimuliert daraufhin die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC) in der Hypophyse. Durch enzymatische Spaltung von POMC entsteht das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), welches anschließend von der Hypophyse in den peripheren Blutkreislauf ausgeschüttet wird. Nach Erreichen der Nebennierenrinde führt ACTH zur Produktion und Sekretion von Glukokortikoiden, den Stresshormonen Kortisol (Mensch) bzw. Kortikosteron (Ratte, Maus). Die Kortisol-Ausschüttung induziert unter anderem den Glykogenabbau und die Lipolyse, um die nötige Energie für die physiologische Adaption bereit zu stellen (Riad *et al.*, 2002). Kontrolliert wird die Aktivität

der HPA-Achse durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus (*negative feedback loop*) an zwei Orten. Kortisol selbst inhibiert in der Hypophyse sowohl die Synthese von POMC als auch die ACTH-Freisetzung. Außerdem hemmt Kortisol die CRH-Synthese im Hypothalamus.

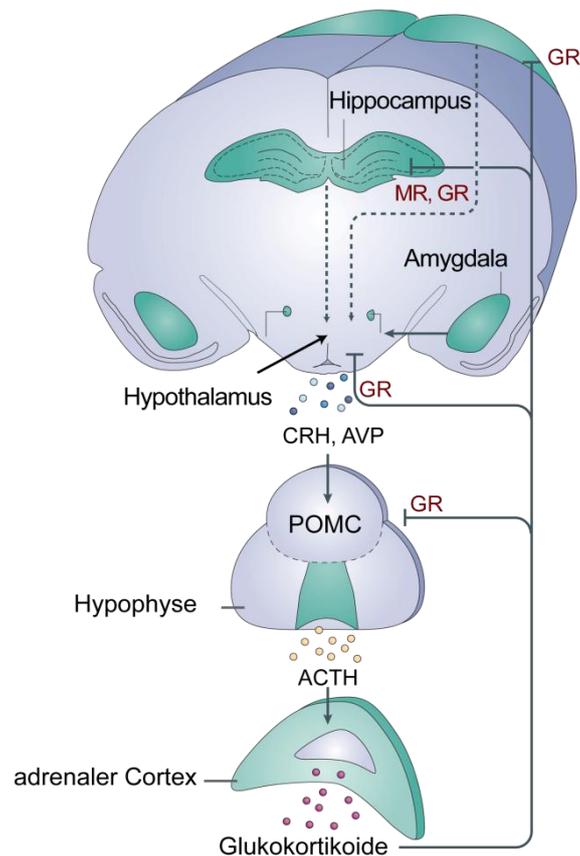


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HPA-Achse. Die Schlüsselregionen der Stressantwort sind der Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde. Ausgehend von einem Stresssignal werden CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*) und AVP (*Arginin-Vasopressin*) ausgeschüttet. Anschließend stimuliert CRH in der Hypophyse die Synthese von POMC (*Proopiomelanocortin*), welches zu ACTH (*adrenocorticotropes Hormon*) prozessiert und in den Blutkreislauf sekretiert wird. In der Nebennierenrinde regt ACTH die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden an. Das Stresshormon Kortisol reguliert die HPA-Achse und somit seine eigene Synthese und Ausschüttung über einen negativen Rückkopplungsmechanismus, sowohl auf Ebene der Hypophyse, als auch der des Hypothalamus (modifiziert, nach (Lupien *et al.*, 2009)). Die Wirkung von Kortisol wird durch die beiden Steroidhormonrezeptoren GR und MR vermittelt.

Vermittelt werden die Signale von Kortisol durch den Glukokortikoid- und den Mineralokortikoidrezeptor (GR und MR) (Abb. 1). Zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Wiederherstellung des Gleichgewichts nach der Stressantwort durch adaptive Prozesse unterliegt die HPA-Achse einer komplexen Regulation, die sich über verschiedene Ebenen erstreckt (Levine, 2000). Eine Dysfunktion der HPA-Achse kann zu erhöhten

Kortisolspiegeln führen, einem als Hyperkortisolismus bezeichneten Phänomen, und ernste psychopathologische Folgen haben. Eine mögliche Konsequenz kann die Entwicklung einer depressiven Störung sein.

1.3 Veränderungen der HPA-Achsen Aktivität bei depressiver Störung

Bereits in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde der in depressiven Patienten beobachtete Hyperkortisolismus als Zeichen einer Hyperaktivität der HPA-Achse gewertet (Board *et al.*, 1957; GIBBONS & McHUGH, 1962). Wenige Jahre später zeigte sich, dass Patienten, die unter schweren Depressionen litten, resistent gegenüber einer Cortisol-Suppression durch Dexamethason (Dex), einem synthetischen Glukokortikoid, waren (Carroll *et al.*, 1968). Einhergehend mit der Genesung, normalisierte sich jedoch die Responsivität auf Dexamethason wieder (Carroll *et al.*, 1968). Im selben Jahr wurde beschrieben, dass eine erfolgreiche Medikation zur Normalisierung der Kortisolspiegel in depressiven Patienten führt (Butler & Besser, 1968).

Die unterschiedlichen HPA-Achsen-Parameter von Patienten und gesunden Kontrollgruppen werden im Dexamethason-Suppressionstest offensichtlich (Abb. 2).

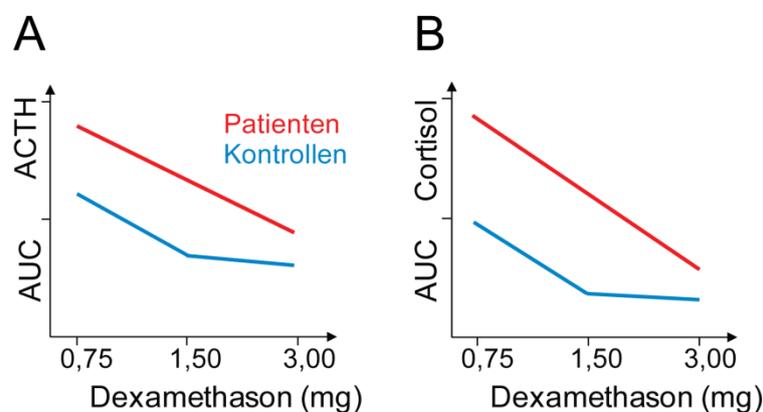


Abbildung 2: Dex-Suppressionstest (DST) in depressiven Patienten und gesunden Probanden.

Beide Gruppen reagieren mit reduzierter Ausschüttung von ACTH und Kortisol in Abhängigkeit der Dexamethason-Dosis. Allerdings weisen Patienten, die an einer depressiven Störung leiden, bereits erhöhte Initialwerte auf, die auch nach Dex-Gabe deutlich über den der Kontrollen liegen (modifiziert, nach Modell *et al.*, 1997). AUC: Fläche unter der Kurve der Zeitreihe (*area under the curve*)

Auf die Applikation steigender Mengen Dexamethason (Dex) reagieren beide Gruppen mit einer Reduktion der ACTH- und Kortisol-Ausschüttung. Im Gegensatz zu gesunden Probanden zeigen depressive Patienten anfangs und auch am Ende höhere Serumspiegel für ACTH und Kortisol (Modell *et al.*, 1997). Um die Veränderungen der HPA-Achsen-Aktivität bei depressiven Erkrankungen detaillierter zu erforschen, wurde ein

kombinierter Dex-CRH-Test eingeführt (Holsboer *et al.*, 1987; Bardeleben & Holsboer, 1989) und als Labortest für psychiatrische Erkrankungen eingesetzt (Heuser *et al.*, 1994).

Die nachfolgende Verabreichung von CRH gibt Aufschluss über eine mögliche zentrale Störung der HPA-Achsen-Regulation. Mit diesem kombinierten Test können HPA-Achsen-Dysregulationen mit einer Rate von 100% (bei unter 35-jährigen) und 84% (bei über 70-jährigen) festgestellt werden (Heuser *et al.*, 1994). Patienten, die nach der Behandlung ein Abklingen oder eine Verbesserung der psychopathologischen Symptome, aber keine verbesserte HPA-Achsen-Aktivität im Dex-CRH-Test zeigen, haben ein statistisch erhöhtes Risiko, einen Rückfall zu erleiden (Zobel *et al.*, 1999).

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Verschlechterung der negativen Rückkopplung der HPA-Achse auf einer verminderten Funktion der Kortikosteroidrezeptoren beruht (Modell *et al.*, 1997), und schließlich weiter zur „Kortikosteroidrezeptor-Hypothese der Depression“ (Holsboer, 2000).

1.4 Die Hypothese des MR/GR-Gleichgewichts

Die Wirkung von Kortisol wird von zwei homologen Steroidhormonrezeptoren (SR) vermittelt, dem Glukokortikoid- und dem Mineralokortikoidrezeptor (GR und MR) (siehe Abb. 1) (de Kloet *et al.*, 1986). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren und sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Außerhalb des Gehirns spielt der GR auch in der Lunge, der Leber, dem Knochenmark und im Immunsystem eine wichtige Rolle (Evans-Storms & Cidlowski, 1995; Schmid *et al.*, 1995). Im Gehirn wird er nahezu ubiquitär exprimiert, während sich der MR auf bestimmte Regionen beschränkt (De Nicola *et al.*, 1998). Der GR ist in hoher Dichte im zerebralen Cortex, dem Riechkolben, im Hippocampus (CA1-, CA2-Region, Gyrus dentatus) und in den Purkinje und granulären Zellen des Zerebellums lokalisiert. Der MR wird im Gegensatz zum GR, im limbischen System und Hypothalamus exprimiert. In pyramidalen Zellen der CA1- und CA2-Regionen colokalisieren beide Rezeptoren (Ahima *et al.*, 1991). In Niere und Dickdarm bindet der MR bevorzugt Aldosteron, ein Mineralokortikoid, das für die Regulation des Salz- und Wasser-Haushalts sowie des Säure-Base Gleichgewichts zuständig ist (Stephenson *et al.*, 1984). Die Bedeutung des MR-Aldosteron-Systems für verschiedene humane Pathologien, wie z.B. der Aldosteron-Resistenz (Zennaro & Lombes, 2004), Bluthochdruck (Lifton *et al.*, 2001) oder Herzinsuffizienz, die mittels Anti-Mineralokortikoiden behoben werden (Pitt, 2004) ist gut belegt. Die Untersuchung von Mäusen, in denen der MR inaktiviert (Berger *et al.*, 1998; Beggah *et al.*, 2002) oder überexprimiert wird (Le Menuet *et al.*, 2001), unterstützt die wichtige Rolle des MR für die Nieren- und Herzfunktion.

Im Gehirn wird der MR primär durch das Stresshormon Kortisol aktiviert.

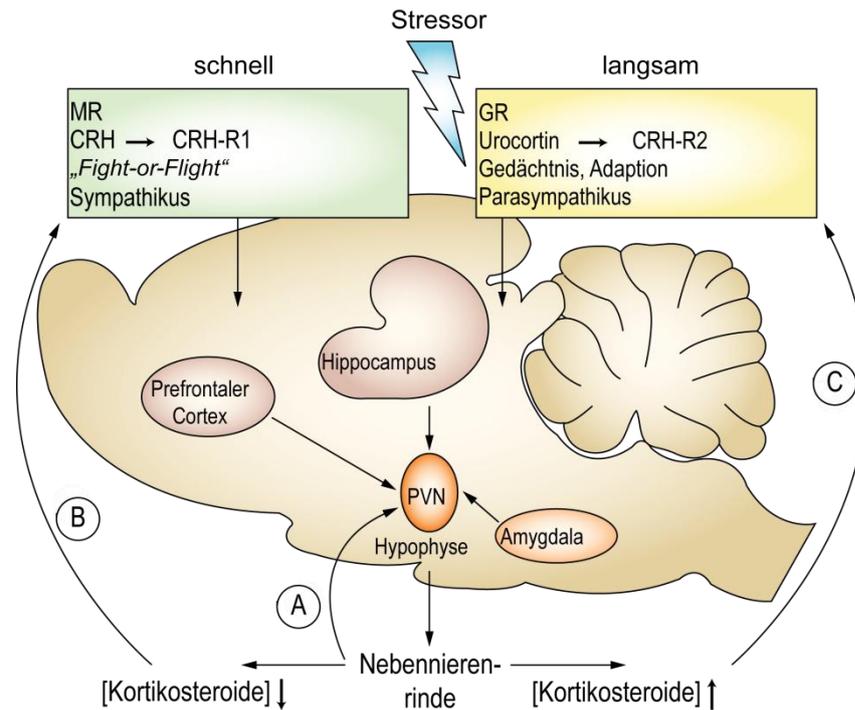


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von GR und MR. (A) Für die Bearbeitung von Stressfaktoren werden Prozesse im limbischen System (Hippocampus, präfrontaler Cortex, Amygdala) benötigt, die transsynaptisch mit dem PVN kommunizieren. Die neuroendokrine Stressantwort führt zu verstärkter Kortisol- bzw. Kortikosteron- (Ratte, Maus) Ausschüttung aus der Nebennierenrinde. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Stressantwort MR- und GR- vermittelt reguliert und kontrolliert. (B) Bei akutem Stress erfolgt zunächst eine schnelle sympathisch vermittelte Stressantwort. Da zu diesem Zeitpunkt noch basale Kortikosteroid-Konzentrationen herrschen, ist der MR aktiv. (C) Mit steigenden Kortikosteroid-Konzentrationen wird stufenweise der GR aktiviert. In dieser Phase findet die langsame Stressantwort statt. Der Organismus wird durch adaptive Prozesse und die Speicherung von Erinnerungen auf zukünftige Stress-Situationen vorbereitet. Es wird angenommen, dass CRH-R2-vermittelte Effekte und das parasympathische Nervensystem zusammen mit dem GR die Wiederherstellung der Homöostase fördern. Ein Ungleichgewicht in der GR- und MR-Funktion gilt als Ursache einer erhöhten Anfälligkeit für Stress-bedingte psychiatrische Erkrankungen (modifiziert, nach de Kloet *et al.*, 2007). CRH-R1, CRH-R2: CRH-Rezeptoren Typ 1 und Typ2.

Reguliert werden die Funktionen des GR und MR im Gehirn hauptsächlich durch eine unterschiedliche Bindungsaffinität für Kortisol bzw. Kortikosteron (Maus, Ratte) (Rupprecht *et al.*, 1993). Diese hat zur Folge, dass unter basalen Bedingungen der MR aktiv ist und erst mit steigenden Kortisolkonzentrationen, wie sie unter Stress erreicht werden, der GR aktiviert wird (de Kloet *et al.*, 1993). Beide Rezeptoren induzieren als Homodimer die Transkription teilweise überlappender, aber auch unterschiedlicher Gene (Datson *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit die Kortisol-Antwort zu modulieren, besteht in der Eigenschaft des GR und MR zur Heterodimer-Bildung (Trapp *et al.*, 1994; Trapp & Holsboer, 1996).

Walter Cannon (1871-1945) prägte den Begriff „*Fight or Flight*“. Er bezeichnete damit die schnelle Stressantwort, die über das sympathische Nervensystem vermittelt wird. Bei akutem Stress erfolgt zunächst eine schnelle Reaktion, in der durch CRH die

Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin veranlasst wird. Dies führt zur Energiebereitstellung, die für das Flucht- oder Kampfverhalten benötigt wird (*fight or flight*). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Kortikoid-Konzentration noch auf basalem Niveau und nur der MR ist aktiv (Abb. 3, links). Nach einigen Sekunden bis Minuten erfolgt der zweite, langsame Teil der Stressantwort. Die Kortikoid-Spiegel steigen und der GR wird stufenweise aktiviert. Jetzt werden adaptive Prozesse und die Speicherung im Gedächtnis aktiviert. Es wird angenommen, dass die Aktivierung von Typ2 CRH-Rezeptoren (CRH-R2) und das parasympathische Nervensystem synergistisch mit dem GR die Erholung bzw. die Wiederherstellung des Gleichgewichts fördern. In dieser Phase wird der Organismus wieder auf künftige Stress-Situationen vorbereitet (Abb. 3, rechts).

Daher besitzt Kortisol generell protektive Eigenschaften, indem es die basale Aktivität der HPA-Achse reguliert und nach akutem Stress zur Wiederherstellung des Gleichgewichts führt. Eine kurzzeitige, kontrollierte Erhöhung der Kortisolspiegel durch Stress kann überlebenswichtig sein, und dient der psychischen und physischen Gesundheit. In dauerhaft überhöhten oder unzureichenden Konzentrationen jedoch wirkt Kortisol gesundheitsschädlich für den Organismus. Nach chronischem Stress, nach einer Behandlung mit Glukokortikoiden oder auch bei einer hyperaktiven HPA-Achse wie in manchen depressiven Erkrankungen wurden neurologische Veränderungen beobachtet (Woolley *et al.*, 1990; Bowley *et al.*, 2002). Durch eine Behandlung mit Antidepressiva oder Glukokortikoid-Antagonisten konnte dies teilweise korrigiert werden (Malberg & Schechter, 2005; Oomen *et al.*, 2007).

Aus diesem Grund gilt die Balance zwischen der Funktion des GR und MR als essentiell für einen gesunden Organismus (de Kloet *et al.*, 1998; de Kloet *et al.*, 2007; de Kloet & DeRijk, 2004).

1.5 Aufbau und strukturelle Domänen von Steroidhormonrezeptoren der Klasse I

Die Familie der nukleären Rezeptoren umfasst eine Vielfalt ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren. SR wie der GR und MR, aber auch der Androgenrezeptor (AR), die beiden Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) und der Progesteronrezeptor (PR), gehören zur Subfamilie 3 der nukleären Rezeptoren (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999) und innerhalb der Steroidrezeptoren zur Klasse I. Somit ist die fachliche Bezeichnung z.B. für den GR NR3C1 (Germain *et al.*, 2006).

SR bestehen hauptsächlich aus drei funktionellen Domänen. Im N-Terminus, dem variabelsten Bereich zwischen den Rezeptorspezies, befindet sich die Aktivierungsdomäne 1 (AF-1 oder $\tau 1$). Das Zentrum bildet die Zink-Finger-DNA-Bindungsdomäne und C-terminal befinden sich Ligandenbindungsdomäne (LBD) und eine zweite Aktivierungsdomäne (AF-2). Die DBD und LBD sind durch die sogenannte Hinge-Region miteinander verbunden (Abb. 4).

Die N-terminale AF1/ τ 1-Domäne des GR ist für die Transaktivierung und die Interaktionen mit bestimmten transkriptionellen Komponenten von Bedeutung (Almlöf *et al.*, 1998; Giguere *et al.*, 1986; Hollenberg *et al.*, 1987; Hittelman *et al.*, 1999; Wallberg *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 2003). AF-1 moduliert die Transkription hormonunabhängig, anders als die C-terminale AF-2, die in ihrer Funktion ligandenabhängig ist (Hollenberg & Evans, 1988). AF-2 vermittelt die Bindung nukleärer Coaktivatoren (Ma *et al.*, 1999; Kucera *et al.*, 2002). Über ein Zink-Finger-Motiv der zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD) bindet der Rezeptor an Hormon-responsive-Elemente (HRE) und induziert die Transkription seiner Zielgene. Im Falle von GR und MR werden diese DNA-Sequenzen GRE (Glukokortikoid-responsive-Elemente) genannt. Die DBD vermittelt zudem die Dimerisierung des Rezeptors an der DNA (Luisi *et al.*, 1991; Reichardt *et al.*, 1998). Über GRE kann die Tanskription durch den GR nicht nur aktiviert, sondern auch reprimiert werden.

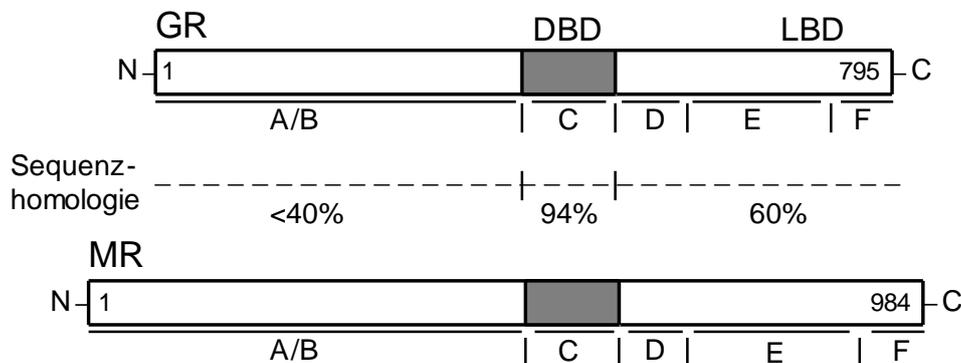


Abbildung 4: Domänenstruktur von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel von GR und MR. Die N-terminale Domäne beider Rezeptoren enthält die Aktivierungsdomäne 1 (AF-1) (A/B). Dieser Bereich besitzt die größte Variabilität zwischen GR und MR. Die größte Sequenzhomologie auf Proteinebene zwischen beiden Rezeptoren besteht in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) (C). Die Hinge-Region (D) und die Ligandenbindungsdomäne (LBD) (E/F), die eine zweite Aktivierungsfunktion (AF-2) enthält, befinden sich am C-Terminus beider Rezeptoren. Die Sequenzhomologie zwischen diesen Domänen liegt bei 60% (modifiziert, nach van der & Meijer, 2008).

Bisher sind drei verschiedene Mechanismen der GR-abhängigen Transrepression bekannt: 1) die Bindung an negative GRE (nGRE) (Sakai *et al.*, 1988; Cairns *et al.*, 1993; Morrison & Eisman, 1993), 2) die Bindung an zusammengesetzte GRE, hier kann der GR sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken (Diamond *et al.*, 1990; Pearce & Yamamoto, 1993; Harrison *et al.*, 1995) und 3) die Transrepression ohne Bindung an die DNA durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF- κ B (Yang-Yen *et al.*, 1990; Ray & Prefontaine, 1994; Scheinman *et al.*, 1995; McKay & Cidlowski, 1998). Im zuletzt genannten Fall erwies sich allerdings die DBD notwendig für die transrepressive Funktion (Jonat *et al.*, 1990; Yang-Yen *et al.*, 1990; Schule *et al.*, 1990; Caldenhoven *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995; McKay & Cidlowski, 1998; Tao *et al.*, 2001).

Um ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren ausüben zu können, müssen die SR in den Zellkern gelangen. Die nukleäre Lokalisation des GR wird durch zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) vermittelt. NLS1 schließt an die DBD an. Dies spiegelt vermutlich einen coevolutionären Selektionsdruck wieder, um dafür zu sorgen, dass DNA-bindende Proteine auch in den Nukleus gelangen (LaCasse & Lefebvre, 1995). NLS2 überlappt mit der LBD-Sequenz. NLS1 ist für den schnellen Transport von Agonist- und Antagonist-gebundenem GR sowie die Lokalisation des ligandenfreien, Hsp-assoziierten GR im Nukleus in G₀ verantwortlich (Savory *et al.*, 1999). NLS2 ist Agonist-spezifisch und vermittelt den nukleären Import des GR auf einem alternativen Weg (Savory *et al.*, 1999). In Abwesenheit des Liganden maskiert die NLS2 die NLS1. Durch eine ligandeninduzierte Konformationsänderung wird NLS1 zugänglich, und der Kernimport kann erfolgen (Cadepond *et al.*, 1992). Anders als beim GR wird der Kerntransport des MR zusätzlich über eine dritte NLS im N-Terminus vermittelt (Walther *et al.*, 2005).

Die C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD) bestimmt das Ligandenspektrum der SR. Unterschiede in der LBD sind hauptsächlich für die Bindungsaffinität für verschiedene Liganden verantwortlich. So weist der MR eine 10-fach höhere Affinität für Kortisol auf als der GR (Rupprecht *et al.*, 1993). Die LBD besteht aus 12 α -Helices, die einen zentralen hydrophoben Kern umgeben. Durch eine ligandenabhängige Strukturänderung wird Helix 12 (H12) repositioniert und bildet mit Helix 3 (H3) und Helix 5 (H5) eine Bindungstasche für transkriptionelle Coaktivatoren (Moras & Gronemeyer, 1998). Durch Veränderungen der Reste, die an einer H3-H5-Interaktion beteiligt sind, können Steroid-rezeptoren zusätzliche Funktionen erhalten (Zhang *et al.*, 2005). So führt eine natürlich vorkommende Mutation in der H5 des MR (S810L) (entspricht H3 im GR, siehe Anhang) zur konstitutiven Aktivität und veränderten Rezeptorspezifität, so dass Antagonisten zu potenten Agonisten werden (Geller *et al.*, 2000). Da diese H3-H5-Interaktion zwischen verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren stark konserviert ist, ist sie vermutlich generell für die Rezeptor-Aktivierung von Bedeutung (Geller *et al.*, 2000). Aus diesem Grund ist die LBD verschiedener SR auch Forschungsobjekt der pharmazeutischen Industrie. Basierend auf der dreidimensionalen Struktur der LBDs werden neue synthetische Liganden entwickelt, die als Agonisten oder Antagonisten die Signaltransduktion verändern können. Als Grundlage dienen bereits existierende Mutationen, die die Rezeptorspezifität verändern.

Neben der Ligandenbindung befindet sich in der LBD eine dritte Aktivierungsdomäne ($\tau 2$) (Milhon *et al.*, 1997) und die Bindungsstelle für Hsp90 (*heat shock 90 kDa protein*) (Xu *et al.*, 1998; Carsonjurica *et al.*, 1989; Schowalter *et al.*, 1991; Chambraud *et al.*, 1990).

Neben der DBD wird auch der Hinge-Region eine Rolle bei der Rezeptor-Dimerisierung zugeschrieben (Savory *et al.*, 2001; Bledsoe *et al.*, 2002).

Durch ihre evolutionäre Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufer (Thornton, 2001) sind die DBD und die LBD die am höchsten konservierten Bereiche der nukleären Rezeptoren aus der Subfamilie 3 (Abb. 4).

1.6 Signaltransduktion durch Steroidhormonrezeptoren

SR sind hormonabhängige Transkriptionsfaktoren, die ligandeninduziert in den Zellkern wandern und die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren (Abb. 5). In Abwesenheit des Liganden werden die Rezeptoren durch Chaperone, primär Hsp90, im Zytosol zurückgehalten. Im Hsp90-Rezeptor-Heterokomplex liegt der Rezeptor in seiner nativen und hormonbindungsfähigen Konformation vor. Nach der klassischen Lehrmeinung diffundieren lipophile Steroidhormone nach ihrer Sekretion in den Blutkreislauf passiv durch die Zellmembran und binden anschließend an die entsprechenden Rezeptoren. Mittlerweile gewinnen Transportproteine, wie z.B. das Kortikosteroid-bindende Globulin (*corticosteroid-binding globulin*, CBG), die durch Bindung der zirkulierenden Steroidhormone deren Verfügbarkeit regulieren, in der Literatur zunehmend an Bedeutung, für die steroidhormonabhängige Signaltransduktion (Petersen *et al.*, 2006).

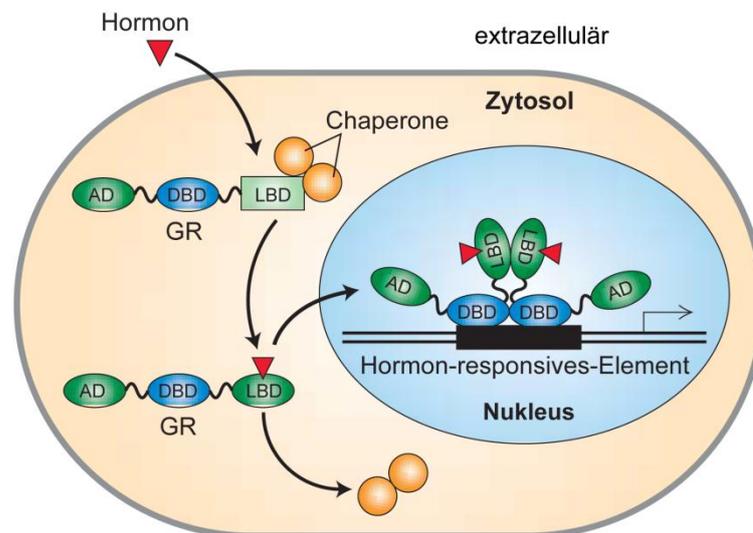


Abbildung 5: Modell für die hormonabhängige Genaktivierung durch einen nukleären Rezeptor am Beispiel des GR. Nach der Bindung des Liganden (Kortisol) dissoziiert der GR teilweise vom Chaperon-Komplex ab und wird in den Zellkern transportiert. Dort angekommen dimerisiert er an spezifische Glukokortikoid-responsive-Elemente (GRE) auf der DNA und aktiviert die Transkription seiner Zielgene (modifiziert, nach Lodish *et al.* 2004).

Durch die Ligandenbindung wird eine Konformationsänderung des Rezeptors verursacht, und gleichzeitig dissoziiert der Rezeptor-Hormonkomplex teilweise vom Chaperonkomplex ab. Bisher ist nicht bekannt, welche Chaperone genau den Rezeptor-Komplex verlassen.

Der GR wird in Abhängigkeit von Hsp90 und einer FKBP-vermittelten Assoziation mit dem Mikrotubuli-Motorprotein Dynein in den Zellkern transportiert (Galigniana *et al.*, 1998; Galigniana *et al.*, 2001; Harrell *et al.*, 2004). FKBP's und andere Hsp90-Cofaktoren enthalten eine sogenannte TPR-Domäne (*Tetratricopeptide Repeats*), die für die Interaktion

mit dem C-Terminus von Hsp90 und teilweise auch mit Hsc70/Hsp70 (*heat shock cognate 70 kDa protein/heat shock 70 kDa protein*) notwendig ist.

Nach dem nukleären Import dimerisiert der Rezeptor an positiven HRE auf der DNA und aktiviert die Transkription spezifischer Zielgene. Handelt es sich um negative HRE, wirkt er als Transrepressor. Im Falle des GR wurde mit der Repression der POMC-Transkription ein Sonderfall beschrieben. Anstelle des GR-Dimers bindet ein GR-Trimer an das nGRE im POMC-Promotor (Drouin *et al.*, 1993).

Auf ihrem Weg vom Zytosol bis hin zur Aktivierung der Transkription kann die Signaltransduktion von SR auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Durch eine Veränderung ihres Expressionsniveaus, durch Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung und durch andere transkriptionelle oder nukleäre Komponenten kann die Signaltransduktion moduliert werden. Eine essentielle Voraussetzung jedoch für die meisten dieser potentiellen Einflussfaktoren ist die adäquate Faltung der SR. Damit SR die korrekte dreidimensionale Struktur erhalten und ihre Fähigkeit zur Ligandenbindung, sind sie auf die Faltungshilfe von Chaperonen angewiesen.

1.7 Faltungszyklus der Steroidhormonrezeptoren

Neben den Hauptakteuren Hsc70/Hsp70 und Hsp90 spielen noch eine Reihe anderer Proteine wie Hsp40, das Adapterprotein Hop, Hip und p23 für die Faltung von Steroidrezeptoren eine wichtige Rolle (Abb. 6).

Bereits während der Translation werden die naszierenden Polypeptidketten von Hsp40 (*heat shock 40 kDa protein*) übernommen und somit dem Faltungszyklus zugeführt (Abb. 6a) (Laufen *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2002). Während der Übergabe an Hsc70/Hsp70 bewirkt die Hsp40-abhängige Hydrolyse von ATP eine starke Bindung von Hsc70/Hsp70 an den Rezeptor (Russell *et al.*, 1999), da ADP-gebundenes Hsc70/Hsp70 eine höhere Substrataffinität besitzt. Das Hsp70-interagierende Protein Hip (*hsp70-interacting protein*) verhindert die Dissoziation von ADP und stabilisiert dadurch den Hsc70/Hsp70-Rezeptorkomplex (Abb. 6b) (Höhfeld *et al.*, 1995). Hop (*hsp-organizing protein*) besitzt drei TPR-Domänen und ist daher in der Lage, gleichzeitig mit Hsc70/Hsp70 und Hsp90 zu interagieren. Hop bindet bevorzugt an ADP-gebundenes Hsp90 (Johnson *et al.*, 1998). Da Hsp90-ADP eine höhere Affinität für Substratpeptide besitzt, wird vermutet, dass Hsp90 durch Hop in den Faltungszyklus eintritt (Abb. 6c). Durch die duale Interaktion von Hop mit Hsc70 und Hsp90 kann der Rezeptor auf Hsp90 transferiert werden (Chen & Smith, 1998).

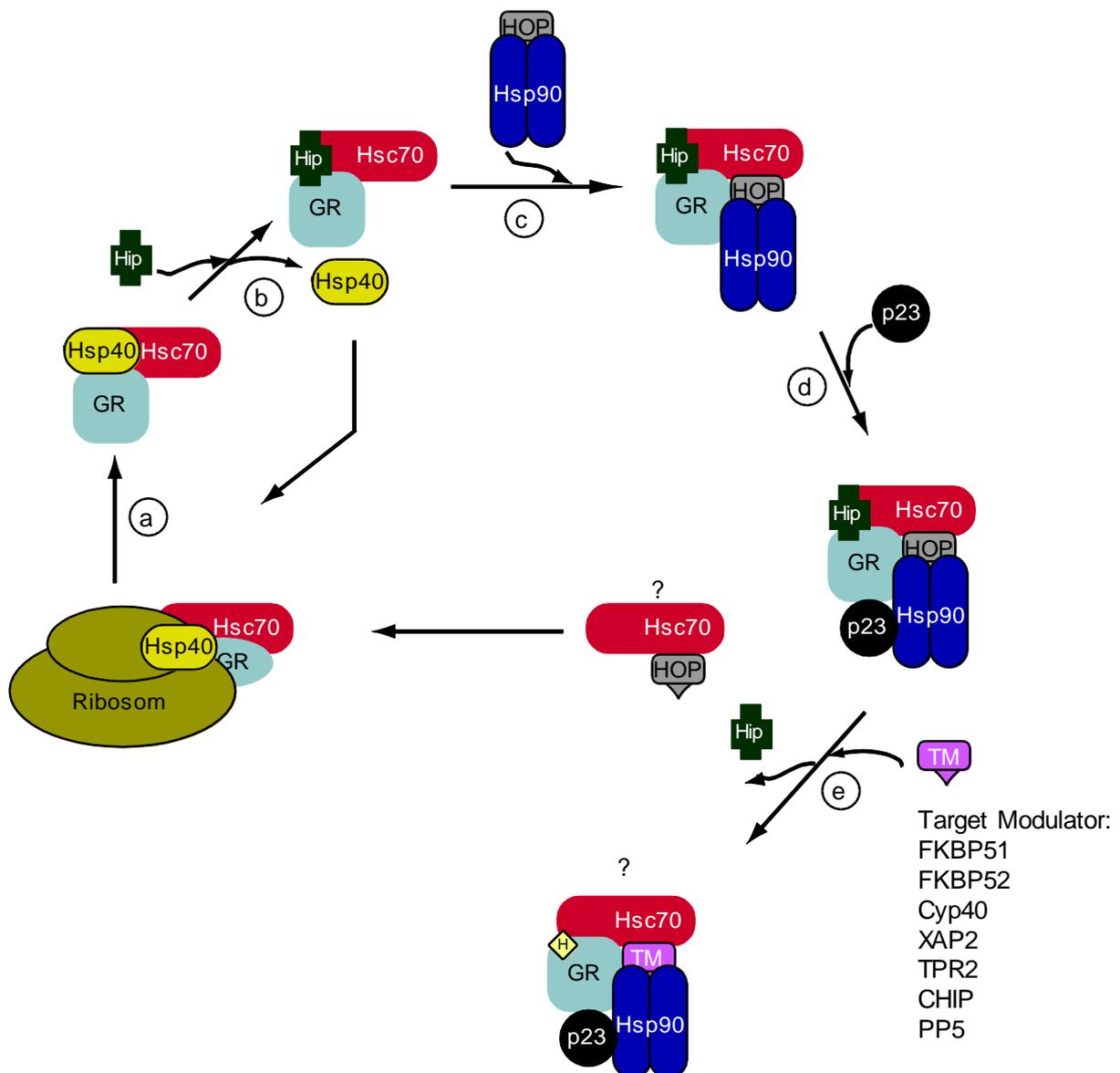


Abbildung 6: Faltungszyklus von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel des GR. Durch einen Hsc70-Hsp90-abhängigen Faltungszyklus erhält die LBD der SR ihre Bindungskompetenz für die Liganden. Die Bindung und Freisetzung der Substratpeptide wird durch ATP angetrieben. Die Hormonbindungsaffinität kann durch verschiedene „Target-Modulatoren“ (TM) beeinflusst werden. Bisher ist nicht bekannt, ob Hsc70 mit Hop den Zyklus verlässt und zu welchem Zeitpunkt Hip austritt. Hsc70 repräsentiert hier Hsc70 und Hsp70. Beispiele für TM: FKBP51/FKBP52 (*FK506 binding protein 51/52*), Cyp40 (*Cyclophilin 40*), XAP2 (*Hepatitis virus B X-associated protein 2*), TPR2 (*J-domain containing cochaperone*), CHIP (*C-terminus of Hsc70 interactin protein*), PP5 (*protein phosphatase 5*) (adaptiert, nach Prescott & Coetzee, 2006).

Das 23 kDa kleine Protein p23 erwies sich, *in vitro*, als Stabilisator für den Hsp90-Hop-Hsc70/Hsp70-Heterokomplex (Dittmar *et al.*, 1997). Es stabilisiert ATP-gebundenes Hsp90 und ist wahrscheinlich für die Substrat-Freisetzung von Hsp90 notwendig (Abb. 6d) (Young & Hartl, 2000). Im nächsten Schritt kann Hop vermutlich durch sogenannte „Target-Modulatoren“ ersetzt werden (Abb. 6e). Hierbei handelt es sich um Proteine, die mindestens eine TPR-Domäne besitzen, das Interaktionsmotiv für die EEVD-Sequenz am C-Terminus

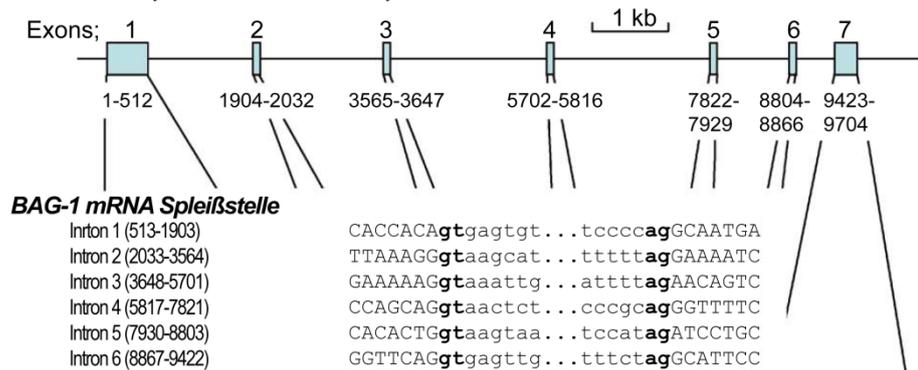
von Hsp90 und Hsc70/Hsp70 (Scheufler *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Interaktionsdomäne können verschiedene TPR-Proteine mit Hop um die Bindung an Hsc70/Hsp70 und Hsp90 konkurrieren. Abhängig von der endogenen Menge und der zelltypabhängigen Komposition der verschiedenen „Target-Modulatoren“, kann die Signaltransduktion von SR moduliert werden. Zu welchem Zeitpunkt Hip genau den Komplex verlässt, ist nicht bekannt, ebenso wenig, ob Hsc70/Hsp70 zusammen mit Hop aus dem Komplex austritt (Abb. 6e). Da die Proteinfaltung ein energieabhängiger Prozess ist, sind Nukleotid-Austauschfaktoren (*nucleotid exchange factor*, NEF) nötig, um das hydrolysierte ADP wieder gegen ATP auszutauschen. Für Hsp90 wurden bisher keine NEF entdeckt. Mit BAG-1 und HspBP1 sind bereits seit längerer Zeit zwei NEF für zytosolisches Hsc70/Hsp70 bekannt (Höhfeld & Jentsch, 1997; Kabani *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde Hsp110 (*heat shock 105kDa/110 kDa protein 1*) als dritter Nukleotid-Austauschfaktor für Hsc70/Hsp70 identifiziert (Dragovic *et al.*, 2006a). Anders als über BAG-1 existiert bisher wenig Literatur über HspBP1 und noch weniger über Hsp110 und deren Beteiligung an physiologischen Prozessen

1.8 BAG-1M und HspBP1: alternative Hsc70/Hsp70-NEF

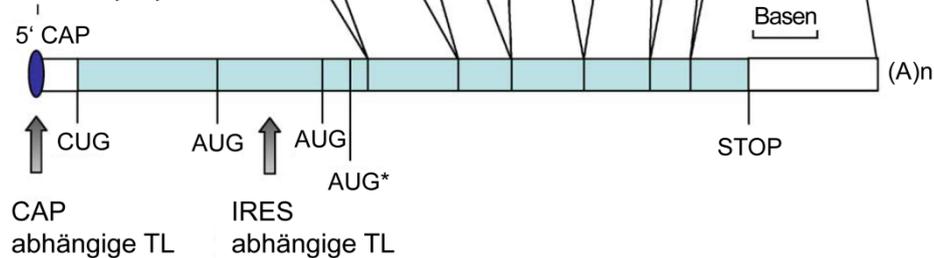
1.8.1 Bcl2-assoziiertes Athanogen 1: BAG-1

BAG-1 wurde ursprünglich als Bcl2 assoziiertes Athanogen, ein antiapoptotisches Protein, identifiziert (Takayama *et al.*, 1995). Im murinen System werden zwei (Packham *et al.*, 1997), im humanen System vier verschiedene Isoformen (Yang *et al.*, 1998) exprimiert. Das humane BAG-1 Gen liegt auf Chromosom 9.12 und besteht aus sechs Introns und sieben Exons (Abb. 7A). Bei den verschiedenen BAG-1-Isoformen handelt es sich nicht um Spleißvarianten, sondern um die Produkte alternativer Translation (Packham *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998) (Abb. 7B). Sie werden durch interne ribosomale Bindungsstellen der BAG-1 mRNA erzeugt und auf diese Weise auch reguliert (Coldwell *et al.*, 2001; Pickering *et al.*, 2003; Pickering *et al.*, 2004, Dobbyn *et al.*, 2008). In der humanen Spezies finden sich BAG-1L (ca. 50kDa), BAG-1M (ca. 46kDa), BAG-1S (ca. 36kDa) (Abb. 7C) und eine kleine, p29 (29kDa) genannte Isoform. Alle BAG-1 Varianten verfügen über dieselbe C-terminale BAG-Domäne, die für die Interaktion mit Hsc70 verantwortlich ist, und unterscheiden sich in der Länge ihres N-Terminus. Interessanterweise startet die Translation von BAG-1L von dem alternativen CTG-Codon. Alle vier Isoformen besitzen eine zentrale Ubiquitin-ähnliche Domäne (*ubiquitin-like domain*, ULD) und sind daher in der Lage, mit dem 26S-Proteasom zu interagieren (Lüders *et al.*, 2000a; Alberti *et al.*, 2003a).

A: BAG-1 Gen, Chromosom 9.12, ~10kb



B: BAG-1 mRNA, ~1,4 kb



C: BAG-1 Protein-Isoformen



Abbildung 7: Schematische Darstellung des BAG-1 Gens und der alternativ translatierten Genprodukte. (A) Das BAG-1 Gen ist auf Chromosom 9.12 lokalisiert und setzt sich aus sechs Introns und sieben Exons zusammen. (B) Die Translation (TL) der BAG-1-Varianten wird durch alternative ribosomale Erkennungssequenzen (IRES, *Internal ribosomal entry site*) gesteuert. Der Translationsstart von BAG-1L ist mit dem alternativen Start-Codon CTG vorgegeben. (C) Im humanen System werden vier verschiedene BAG-1-Isoformen exprimiert, BAG-1L, BAG-1M und BAG-1S, die kürzeste Isoform, p29, ist hier nicht dargestellt. Einzig BAG-1L enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und wurde fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert gefunden. Alle vier Isoformen besitzen eine ULD (*ubiquitin-like domain*) und eine unterschiedliche Anzahl des E2X4-Motivs. Alternativ sind BAG-1L und BAG-1M auch unter den Namen Hap50 (*Hsc70/Hsp70-associating protein*) und Hap46/RAP46 (*receptor-associating protein of 46-kDa*) in der Literatur zu finden. BAG-1S wird häufig nur als BAG-1 bezeichnet (modifiziert, nach Townsend *et al.*, 2005).

Außerdem besitzt BAG-1 die Eigenschaft, an DNA zu binden und transkriptionelle Prozesse zu modulieren (Tab. 1). Im N-terminalen Bereich befindet sich eine E₂X₄-Domäne, die abhängig von der entsprechenden Isoform aus unterschiedlichen Wiederholungen von zwei Glutamat- und vier variablen Serin- und Threonin-reichen Aminosäure-Resten besteht (Abb. 7C). Die DNA-Bindung von BAG-1M erfordert drei N-terminale Lysin-Reste (siehe

Tab. 1, (Schmidt *et al.*, 2003). BAG-1L besitzt am N-Terminus eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und ist als einzige BAG-1-Isoform fast ausschließlich im Zellkern zu finden (Packham *et al.*, 1997; Takayama *et al.*, 1998; Knee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, in Vorbereitung).

BAG-1M wird laut Literatur mit dem GR in den Zellkern transportiert (Schneikert *et al.*, 1999). Hauptsächlich befindet sich BAG-1M in unterschiedlichen Mengen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern (Takayama *et al.*, 1998; Knee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, in Vorbereitung). BAG-1S wurde zytosolisch und auch nukleär detektiert (Takayama *et al.*, 1998; Knee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, in Vorbereitung). Diese Studien lassen vermuten, dass die intrazelluläre Verteilung der BAG-1-Isoformen zelltypabhängig ist.

Kurz nach seiner Entdeckung wurde die Eigenschaft eines Modulators der Hsc70/Hsp70-Chaperon-Aktivität an BAG-1 entdeckt (Takayama *et al.*, 1997; Zeiner *et al.*, 1997). Mit der Identifikation als Hsc70/Hsp70-NEF (Höhfeld & Jentsch, 1997) gelang es, die Funktion von BAG-1 detaillierter zu analysieren. Ungefähr im selben Zeitraum fand man heraus, dass BAG-1 die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 auch negativ regulieren kann (Bimston *et al.*, 1998; Nollen *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit faltungsrelevanten Cofaktoren verhindert BAG-1M die Bindung von Hop an Hsc70/Hsp70 (Gebauer *et al.*, 1998) und ist ein dominanter Gegenspieler zu Hip (Kanelakis *et al.*, 2000; Nollen *et al.*, 2001). BAG-1 und Hip konkurrieren um die Bindung an die ATPase-Domäne von Hsc70/Hsp70 (Gebauer *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist BAG-1 in der Lage, konzentrationsabhängig die Faltung des GR auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen (Kanelakis *et al.*, 1999).

Im Laufe der Zeit wurden viele zelluläre Funktionen für BAG-1 aufgeklärt, manche davon Isoformen-spezifisch (Tab. 1). So wurde z.B. die Wirkung von BAG-1 auf verschiedene SR häufig untersucht (Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003; Cutress *et al.*, 2003; Guzey *et al.*, 2000; Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003). Überraschenderweise konnte weder für BAG-1L noch BAG-1M, die beide die transkriptionelle Aktivität des GR inhibieren (Tab. 1), ein Einfluss auf die Transaktivierungsfunktion des Mineralokortikoidrezeptors (MR) beobachtet werden (Schneikert *et al.*, 1999). BAG-1M gilt bis heute als Diskriminationsfaktor für GR und MR (Crocoll *et al.*, 2000).

Tabelle 1: Auswahl einiger bekannter zellulärer Funktionen von BAG-1 (adaptiert, Lüders et al., 2000b)

Funktion	Isoform von BAG-1	Zitation
Bindung an Bcl-2, antiapoptotisch	BAG-1	(Takayama <i>et al.</i> , 1995; Clevenger <i>et al.</i> , 1997)
Bindung und Aktivierung der Raf-1 Kinase	BAG-1	(Wang <i>et al.</i> , 1996)
Bindung und erhöhter Apoptose-Schutz durch HGF-Rezeptor (<i>hepatocyte growth factor</i>) und PDGF-Rezeptor (<i>platelet-derived growth factor</i>)	BAG-1	(Bardelli <i>et al.</i> , 1996)
Unterdrückung der Siah-vermittelten Inhibition des Zellwachstums	BAG-1	(Matsuzawa <i>et al.</i> , 1998)
Inhibition der DNA-Bindung und der Transaktivierung des GR; Schutz vor Hormon-induzierter Apoptose	BAG-1L, BAG-1M, BAG-1S kein Effekt	(Kullmann <i>et al.</i> , 1998; Schneikert <i>et al.</i> , 1999; Schmidt <i>et al.</i> , 2003)
Stimulierung der Transaktivierungsaktivität des AR	BAG-1L, BAG-1M kein Effekt BAG-1S kein Effekt	(Froesch <i>et al.</i> , 1998)
Stimulierung der Transaktivierungsaktivität des ER	BAG-1L	(Cutress <i>et al.</i> , 2003)
Stimulierung der Transaktivierungsfunktion des Vitamin D-Rezeptors (VDR)	BAG-1L	(Guzey <i>et al.</i> , 2000)
Bindung und Inhibition der Transaktivierungsaktivität des RAR; Inhibition der Retinsäure-induzierten Apoptose	BAG-1	(Liu <i>et al.</i> , 1998)
Zunehmende Zell-Motilität von Magenkrebszellen	BAG-1	(Naishiro <i>et al.</i> , 1999)
Bindung an DNA und Stimulierung der Transkription	BAG-1M, BAG-1L BAG-1S kein Effekt	(Niyaz <i>et al.</i> , 2001; Zeiner <i>et al.</i> , 1999)
Proteasomaler Abbau des GR in Kooperation mit der E3-Ligase CHIP	BAG-1	(Demand <i>et al.</i> , 2001)

Bisher finden sich keine Studien zur Wirkungsweise von BAG-1 auf den Progesteronrezeptor (PR). Da dieser Verwandte des GR auch in Hirnregionen exprimiert wird, die relevant für die Stressregulation sind (Kato, 1994; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; Guerra-Araiza *et al.*, 2003), ist er ein interessanter Kandidat für genauere Untersuchungen. Seit kurzem wird auch über die Beteiligung des PR an der Regulation der Neurogenese und Kognition diskutiert (Brinton *et al.*, 2008).

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass BAG-1 auch für die neuronale Architektur und psychiatrische Erkrankungen eine Rolle spielt. BAG-1 gilt als Marker und Regulator für neuronale Differenzierung (Kermer *et al.*, 2002), als neuroprotektiver Faktor (Götz *et al.*, 2005; Liman *et al.*, 2005) und fördert das Neuritenwachstum (Planchamp *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit Alzheimer scheint BAG-1 den proteasomalen Abbau des tau-Proteins zu regulieren (Elliott *et al.*, 2007). Unlängst wurden im Hippocampus von Alzheimer-Patienten eine erhöhte Menge BAG-1M sowie eine Assoziation mit tau und APP festgestellt (Elliott *et al.*, 2009). Seit wenigen Jahren gilt BAG-1 als Ziel für Stimmungsstabilisatoren nach längerer Behandlung (Zhou *et al.*, 2005). In einem Tiermodell wurde es bereits als wichtiger Faktor für die Revertierung von Verhaltensbeeinträchtigungen, ähnlich wie sie bei Depression oder Manie vorkommen (Maeng *et al.*, 2008), diskutiert. Bisher galten alle Effekte von BAG-1 Hsc70/Hsp70-abhängig (Townsend *et al.*, 2005).

1.8.2 Hsp70-bindendes Protein 1: HspBP1

Über HspBP1 (*hsp70 binding protein*) ist im Gegensatz zu BAG-1 weniger bekannt. 1998 wurde HspBP1 als Protein identifiziert, welches die ATPase-Aktivität von Hsp70 inhibiert und die Hsp40-abhängige Rückfaltung denaturierter Hsc70/Hsp70-Substratproteine inhibiert (Raynes & Guerriero, Jr., 1998). HspBP1 wird von sieben Exons codiert und besteht zu 35% aus α -helikalen Bereichen (McLellan *et al.*, 2003). Es weist eine signifikante Homologie zum humanen S11 Protein, einem NEF des ER-Chaperones BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) (Tyson & Stirling, 2000) und Sequenzähnlichkeiten zu BAP (*BiP-associated protein*) auf (Chung *et al.*, 2002). HspBP1 kann in zwei Domänen unterteilt werden, Domäne I (AS 1-83) und Domäne II (AS 84-359) (McLellan *et al.*, 2003). 2005 wurde die Kristallstruktur von HspBP1 gelöst und es wurden vier zentrale, sich wiederholende Einheiten entdeckt, die aus drei Helices bestehen und strukturell die größte Ähnlichkeit mit dem Armadillo-Motiv aufweisen (Shomura *et al.*, 2005). Für die Bindung an Hsp70, die Veränderung der ATPase-Domäne und auch für die Inhibition der Rückfaltung von Substratproteinen ist die Domäne II notwendig (McLellan *et al.*, 2003). Des Weiteren besitzt HspBP1 eine höhere Bindungsaffinität für Hsp70, als Hsp40 (Oh & Song, 2003). Einhergehend mit der strukturellen Analyse wurde HspBP1 als alternativer Hsp70-NEF zu BAG-1 beschrieben, und der mechanistische Unterschied zwischen BAG-1 und HspBP1 in ihrer Wirkung auf die ATPase-Domäne von Hsp70 wurde aufgeklärt (Shomura *et al.*, 2005).

Anders als BAG-1 inhibiert HspBP1 den CHIP-induzierten Proteinabbau (Alberti *et al.*, 2004). In Tumorzellen scheint HspBP1 mit höherer Affinität an Hsp70 als an Hsc70 zu binden und die essentielle Funktion von Hsp70 zu antagonisieren (Tanimura *et al.*, 2007).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Cochaperonen auf die Funktion des GR und verwandter SR vergleichend untersucht werden.

Ein Ziel war es, den Einfluss von BAG-1M auf einen weiteren SR der Klasse I, den Progesteronrezeptor (PR), zu testen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich ein allgemeines Wirk-Prinzip von BAG-1 durch die Interaktion mit bestimmten Rezeptor-Domänen ableiten lässt.

Im zweiten Abschnitt werden die beiden Hsc70/Hsp70-Nukleotid-Austauschfaktoren BAG-1M und HspBP1 in ihrer Wirkung auf die SR-Funktion verglichen. Ziel war es, mit Hilfe unterschiedlicher Strategien herauszufinden, ob es mechanistische Unterschiede zwischen BAG-1M und HspBP1 gibt. Am Anfang sollte die Suche nach neuen und Hsc70/Hsp70-unabhängigen Interaktionspartnern stehen, um durch möglicherweise unterschiedliche Interaktionsspektren neue Informationen über den intrazellulären Wirkungsbereich von BAG-1M und HspBP1 als Hsc70/Hsp70-NEF zu erhalten. In einer weiteren Versuchsreihe sollte der Einfluss von HspBP1 auf die Aktivität verschiedener SR mit dem von BAG-1M verglichen werden. Im Anschluss daran sollte geklärt werden, ob sich die resultierenden Unterschiede durch einen differentiellen Einfluss auf das konstitutiv exprimierte Hsc70 erklären lassen. Mit Hilfe von Interaktionsanalysen sollte festgestellt werden, ob BAG-1M und HspBP1 die Zusammensetzung des Hsc70-Rezeptor-Heterokomplexes unterschiedlich beeinflussen. Mit Hormonbindungsanalysen sollte schließlich überprüft werden, ob sich der beobachtete Unterschied auch in Hsc70/Hsp70-abhängigen Faltungsprozessen bemerkbar macht.

Im dritten Kapitel werden Struktur-Affinitätsbeziehungen des MR als Vorarbeiten für ein transgenes Tiermodell vorgestellt. In diesem Tiermodell soll in naher Zukunft die Relevanz der MR/GR-Balance für die Stressbewältigung überprüft werden. Es sollen Tiere generiert werden, deren HPA-Achsenaktivität unter basalen Bedingungen der von Wildtyp-Tieren entspricht. Unter Stress jedoch sollte das Kortisol-Signal nicht nur auf den endogenen GR, sondern zusätzlich auf einen mutierten MR umgeleitet werden (Abb. 8). Dies könnte eine Wiederherstellung des MR/GR-Gleichgewichts herbeiführen.

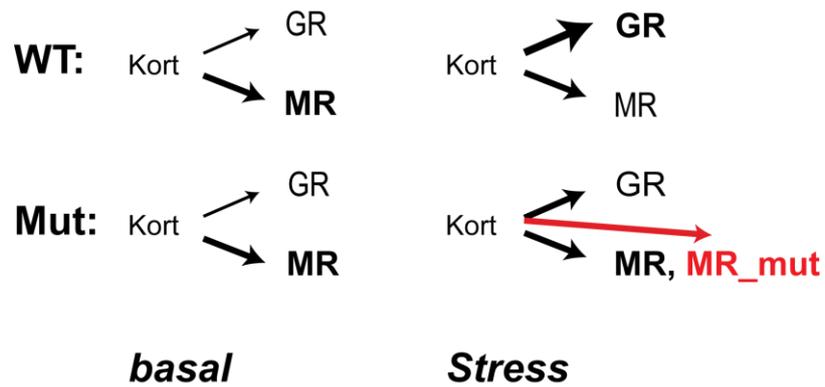


Abbildung 8: Stressmodell zur Überprüfung der Bedeutung der MR/GR-Balance für die Stressbewältigung. Unter stressfreien Bedingungen sollten sich die transgenen Tiere (Mut) wie Wildtypen verhalten (WT). Unter Stress werden die Effekte von Kortikosteron (Kort) im Wildtyp (WT) über den GR vermittelt. In den genetisch veränderten Mäusen (Mut) sollte das Stresssignal zusätzlich auf einen mutierten MR umgeleitet werden. Auf diese Weise würde das MR/GR-Gleichgewicht unter Stress wieder hergestellt werden.

Durch zwei strategisch unterschiedliche Ansätze sollten mMR-Mutanten generiert werden, die eine GR-ähnliche Kortikosteron-Affinität besitzen. Dies hätte zur Folge, dass beide MR-Mutanten erst in Anwesenheit höherer Kortikosteronkonzentrationen transkriptionell aktiv sind. Die Hormonabhängigkeit dieser mMR-Mutanten wurde anschließend funktionell validiert.

2 Material

2.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid 30% (37,5:1)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
AG 1-X8 Resin	BioRad, München
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	PEQLAB, Erlangen
Aktivkohle	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin Standard	Thermo scientific, Pierce
Aldosteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Amidoschwarz	USB Corporation, Cleveland, USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antibiotikum/Antimycotikum 10x	Invitrogen, Karlsruhe
APS (Ammonium-peroxo-disulfat)	Roth, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bisbenzimid	VWR, Ismaning
β -Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt,
Bovine Albumin Serum Fraktion V	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dextran T70	Roth, Karlsruhe
Dihydrotestosteron (5 α -Arostan-17 β -ol-3-on)	Fluka, Deisenhofen
Di-Kalium-Hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D-Luciferin	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTPs	PEQLAB, Erlangen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe

Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
ExGen 500	Fermentas, St. Leon-Roth
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
Fludrocortisonacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HBSS 10x mit Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
HCl 1N	Merck, Darmstadt
HCl 2N	Merck, Darmstadt
HCl 37%	Merck, Darmstadt
IgG	BioRad, München
Immobilon Western (<i>chemiluminescent HRP substrate</i>)	Millipore, Eschborn
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
Kodak GBX Developer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kodak GBX Fixer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kortikosteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
[1, 2, 6, 7- ³ H]-Kortikosteron	Perkin Elmer, Rotgau Jügesheim
Kortisol (17-Hydroxycorticosteron)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB broth Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Luminol	Fluka, Deisenhofen
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgCl ₂	Merck, Darmstadt

MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Coop, Schweiz
Na ₂ MoO ₄ (Natriummolybdat-Dihydrat)	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaMops	Roth, Karlsruhe
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaOH 2N	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat 10x	Invitrogen, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PBS 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Coumarinsäure (<i>p-coumaric acid</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PCR-Primer	MWG, Ebersberg
PMSF (Penylmethylsulfonyl-Fluorid)	Calbiochem, Frankfurt
Ponceau S Lösung	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Progesteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyruvat 10x	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Szintillationslösung (Luma safe-advanced safety LSC)	Perkin Elmer, Rotgau Jügesheim
SDS	Serva Electrophoresis, Heidelberg
SDS 20% (l)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2 Verbrauchsmaterial

Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Eppendorfreaktionsgefäße 1,5ml <i>low binding</i>	Eppendorf, Hamburg
Fujifilm X-Ray 18x24 100NF	Röntgen Bender, Baden Baden
Kryoröhrchen 2 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Mikrotiterplatte 384-Well, schwarz, " <i>low binding</i> "	Corning, New York, USA
Mikrotiterplatte 96-Well	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Nitrozellulose Transfer Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen unsteril	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer, Rotgau Jügesheim
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Whatman Papier 3mm	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen 150 cm ² , 75 cm ²	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Zellkulturschalen 60 cm ²	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Zellschaber steril	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsendonucleasen

BamHI	New England Biolab, Frankfurt am Main
DpnI	Stratagene, Amsterdam
EcoRI	New England Biolab, Frankfurt am Main
Hind III	New England Biolab, Frankfurt am Main
NotI	New England Biolab, Frankfurt am Main
XhoI	New England Biolab, Frankfurt am Main

Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden Puffern und, wenn benötigt, 100xBSA geliefert

2.3.2 DNA-Polymerasen

Herculase fusion II incl. 5x Reaktionspuffer und DMSO	Stratagene, Amsterdam
Pico-Maxx incl. 10x Reaktionspuffer	Stratagene, Amsterdam
Pfu-Turbo incl. 10x Reaktionspuffer	Stratagene, Amsterdam
Pwo incl. 10x Reaktionspuffer komplett	PEQLAB, Erlangen
Taq incl. 10x Reaktionspuffer	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.3 Sonstige Enzyme

T4-DNA Ligase	New England Biolab, Frankfurt am Main
RNAse A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MutL-Reverse Transkriptase	New England Biolab, Frankfurt am Main

2.4 Marker

Benchmark TM Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Peq-Gold Proteinmarker IV	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Peq-Gold Proteinmarker V	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PeqGold DNA Leiter-Mix	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

2.5. Antikörper

Primär	Verdünnung	monoklonal	Wirt	Bezugsquelle
anti-Aktin	1:3000 1x TBST		Ziege	Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-BAG-1	1:3000; 5% Milch in 1x TBST		Kaninchen	Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-Chip	1:3000 ; 5% Milch in 1x TBST		Kaninchen	Calbiochem, San Diego, USA
anti-Flag M2	1:5000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Flag-HRP	1:10.000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-HA-HRP, High Affinity (3F10)	1:10.000; 5% Milch in 1x TBST	+	Ratte	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-Hip (p48)	1:5000; 5% Milch in 1x TBST		Kaninchen	Biomol GmbH, Hamburg
anti-Hop (p60)	1:5000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Biomol GmbH, Hamburg
anti-Hsc70 (B-6)	1:5000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-Hsp40 (Hdj1)	1:5000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Biomol GmbH, Hamburg
anti-Hsp70 (W27)	1:5000; 5% Milch in 1x TBST	+	Maus	Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-Hsp90	1:5000; 5% Milch in 1x TBST		Kaninchen	Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti -HspBP1 (FL4)	1:1000; 5% Milch in 1x TBST		Kaninchen	Delta Biolabs, Kalifornien, USA
anti-p23	1:3000; 5% Milch in 1x TBST		Maus	ABR Affinity Bio Reagents, Golden, USA
anti-Rpt6	1:3000; 5% Milch in 1x TBST		Maus	Biomol GmbH, Hamburg
Sekundär				
anti-mouse IgG	1:10000; 5% Milch in 1x TBST		Ziege	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-rabbit IgG	1:10000; 5% Milch in 1x TBST		Ziege	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-goat IgG	1:5000; 2% Milch in 1x TBST		Esel	Santa Cruz, Kalifornien, USA

Antikörpergekoppelte Agarose- und Elutionspeptide				
anti-Flag M2 Affinity Gel		+	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-HA High Affinity		+	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1x Flag-Peptid	100 ng/μl in TBS			Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1x Ha-Peptid	100 ng/μl in PBS			Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.6 Zelllinien und Bakterienstämme

2.6.1 Zelllinien

Cos-7	Niere, <i>african green monkey</i>	MPI für Neurobiologie (AG Klein, Martinsried)
HEK 293	Niere, embryonal, human	ATCC, CCL 1573
SK-N-MC	Neuroblastom, human	ATCC, HTB10
HeLa	Cervixkarzinom, human	ATCC, CCL2
Neuro-2A	Neuroblastom, murin	DSMZ, ACC 148
HT22	hippocampal, Maus	Dr. Schubert (The Salk Institut; San Diego, USA)

2.6.2 Bakterienstämme

DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
F- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	

2.7 Allgemeine Plasmide

Name	Insert	Vektor	Bezugsquelle/Referenz
pRK5-SV40-MCS	Klonierungs- und Kontrollvektor	Expressionsvektor für Säugerzellen; CMV-Promotor; Puromycin-Resistenz; Ampicillin-Resistenz	(Wochnik, 2004)
pRK7	Klonierungs- und Kontrollvektor	Expressionsvektor für Säugerzellen; CMV-Promotor; Ampicillin-Resistenz	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
HA-PR	humaner PR; N-Terminales HA-Epitop	pRK7	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
HA-AR	humaner AR; N-Terminales HA-Epitop	pRK7	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
HA-GR	humaner GR; N-Terminales HA-Epitop	pRK7	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
HA-MR	humaner MR; N-terminales HA-Epitop	pRK7	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
pet-HspBP1	humanes HspBP1;	pet28 a (Novagen); bakt. Expressions-vektor; T7-Promotor; Kanamycin-Resistenz	U. Hartl; MPI für Biochemie (Martinsried)
BAG-1M-Mut	BAG-1M_mut (R237A); Hsc70/Hsp70-Interaktionsmutante (Sondermann et al, 2002)	pRK5-SV40-MCS	U. Schmidt; MPI für Psychiatrie
Flag-BAG-1M	BAG-1M; N-terminales Flag-Epitop	pRK5-SV40-MCS	U. Schmidt; MPI für Psychiatrie
FKBP51-Flag	humanes FKBP51; C-Terminales Flag-Epitop	pRK5-SV40-MCS	(Wochnik, 2004)
EGFP-mGR	mGR; N-Terminal GFP fusioniert	pEGFP-C1	D.Spengler, MPI für Psychiatrie
Gaussia			
Gaussia-KDEL	<i>Gaussia princeps</i> Luciferase	pRK5-SV50-MCS	(Schülke, 2009)
MMTV-Luc	Reporterplasmid; <i>Firefly</i> -Luciferase; MMTV-Promotor		(Hollenberg & Evans, 1988)

2.8 Klonierte Plasmide

Name	Vektor	Herstellung	RE	Primer-Nr. (S. 30 ff)	Zyklen [x] und Annealing-Temp. [°C]
HA-PR					
HA-PRΔN	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: HA-PR	XhoI NotI	2/9	30x 60°C
HA-PRΔC	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: HA-PR	XhoI NotI	1/13	5x 45°C; 25x 60°C
HA-PRΔH1	pRK5-SV40-MCS	Klonierung und Ligation via PCR; Template: HA-PR, a) und b)	XhoI NotI	a: 3/9; b: 1/11	a: 5x 45°C; 20x 60°C b: 25x 60°C Ligation a + b: 30x 60°C
HA-PRΔH	pRK5-SV40-MCS	Klonierung und Ligation via PCR; Template: HA-PR, a) und b)	XhoI NotI	a: 1/12 b: 7/9	a: TD: 56°C-50°C; insgesamt 30x b: 5x 45°C; 25x 60°C Ligation a + b: 5x 50°C; 25x 60°C
HA-PRΔDBD	pRK5-SV40-MCS-HA	Klonierung und Ligation via PCR; Template: HA-PR, a + b	XhoI NotI	a: 1/10 b: 6/9	a, b: 30x 60°C Ligation a + b: 5x 43°C; 25x 60°C
HA-PRΔ494-562	pRK5-SV40-MCS	Klonierung und Ligation via PCR; Template: HA-PR, a + b	XhoI NotI	a: 1/14 b: 8/9	a, b: 5x 45°C; 25x 60°C Ligation a + b: 30x 63°C
HA-PR Δ494-562/ΔH	pRK5-SV40-MCS	3-Fragmenten-Ligation aus HA-PR-Δ494-562 und HA-PRΔH	XhoI/NotI DraI		
HA-PR-DBD	pRK5-SV40-MCS-HA	PCR; Template: HA-PR	XhoI NotI	4/13	30x 60°C
HA-PR-DBDH	pRK5-SV40-MCS-HA	PCR; Template: HA-PR	BamHI NotI	4/15	5x 45°C; 25x 60°C
HA-PR-494-641	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: HA-PR	BamHI NotI	2/13	30x 60°C

BAG-1/HspBP1						
Flag-BAG-1M_mut (R237A)	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: BAG-1M_mut	EcoRI BamHI	17/18	5x 49°C; 25x 60°C	
Flag-BAG-1M_Ubidel (Δ89-134)	pRK5-SV40-MCS;	Klonierung und Ligation via PCR; Template: Flag-BAG-1M, a + b	EcoRI BamHI	a: 17/20 b: 19/18	a, b: 30x 60°C Ligation a + b TD: 66°C-60°C; insgesamt 30x	
Flag-HspBP1	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: pet-HspBP1	XhoI/NotI	21/22	5x 51°C; 25x 60°C	
Flag-HspBP1_mut (A137R/K249A) (Shomura et al, 2005)	pRK5-SV40-MCS	Klonierung und Ligation via PCR; Template: pet-HspBP1, a + b + c	XhoI NotI	a: 23/26 b: 24/22 c: 21/25	a, b, c: 5x 51°C; 15x 60°C Ligation a + b + c: 30x 60°C	
mMR/mGR						
pRK7-mMR	pRK7 EagI/XhoI	PCR; Template: a) cDNA; b) Produkt a); c) Mutagenese	EagI XhoI	a: 28/29 b: 30/31 c: 32/33 und 34/35	a, b: 30x 57°C c: 30x 55°C	
mMR	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: pRK7-mMR	XhoI NotI	40/41	5x 53°C; 25x 60°C	
Flag-mMR	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: pRK7-mMR	XhoI NotI	43/41	5x 53°C; 25x 60°C	
mGR	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: EGFP-mGR	XhoI NotI	38/39	5x 53°C; 25x 60°C	
Flag-mGR	pRK5-SV40-MCS	PCR; Template: mGR	XhoI NotI	43/39	5x 53°C; 25x 60°C	

Die Klonierungsstrategie ist durch die Restriktionsstellen (RE) angegeben

2.9. Primer

Nr.:	Name	Sequenz	RE
	HA-PR		
1	5-XhoI_HA	TATTA CTCGAGATGGCTACCCCTACGACGTGCCCG	XhoI
2	5-Xho_HA-PR494_2	TATTA CTCGAGATGGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTCCCTCGGATCC GGCTGCCCTCCACCTCCG	XhoI
3	5-hPRwoHI	CCTTGGAGGTCGAAAATTTAAACCATTGGGGGTTCCAAATGAAAGCCAAG	-
4	5-BamHI_PRDBD	CCTC GGATCCCTCAGAAAGATTTGTTTAAATCTGTGGGATG	BamHI
5	5-EcoRI_PRDBD	GCTAAGAAATTC ATGCCTCAGAAAGATTTGTTTAAATCTGTGGGATG	EcoRI
6	5-hPRwoDBD	CAATACAGCTTCGAGTCATTAAGTTCAATAAAGTCAGAG	-
7	5deltaH	GGTCCITGGAGGTCGAAAATTTAAACCACCACTGATCAACCTGTTAATG	-
8	5delta494	GCCTGCTCCCGGGACCCTCAGAAAGATTTGTTTAAATCTGTGG	-
9	3-Not PR	ATAGGGCCGCTCACITTTTATGAAAGAGAAAGGGG	NotI
10	3-hPRwoDBD	CTCTGACTTTATTGAACCTTAATGACTCGAAGCTGTATTG	-
11	3-hPRwoHI	CATTGGAACGCCCAATGGTTTAAATTTTCGACCTCCAAGGACCATGCCAG	-
12	3deltaH	CATTACAGGTTGATCAGTGGTGGTTTAAATTTTCGACCTCCAAGGACC	-
13	3-Not PR641	ATAGGGCCGCTCACITTTTAAATTTTCGACCTCCAAGGACCATGCC	NotI
14	3delta494	CCACAGATTAACAATACTTCTGAGGGTCCCGGGGAGCAGGC	-
15	3-NotPR_684	ATAGGGCCGCTCAAATCAACTGTATGTCTTGACCTGGTG	NotI
16	BAG-1/HspBP1		
17	BAGNFlag	TCCGAATTC ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGAAGAAAGAAAACCCGG	BamHI
18	BagIM DNAPLAG ^{Eco}	CCAGAATTC ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCGGAGCGGAGGTTG	EcoRI
19	BAGIM Ubidelfor	CAATGAGAAGCAGCACCTTCATGTCACCTTGGAAATACAAGATGGTTG	-
20	BAGIM Ubidelrev	CAACCATCTTGATTCCAAAGTGCAACATGAAGGTCTGCTTCTCATTTG	-
21	HspBP1start XhoFLAG	TGACTCGAGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCAGACGAAAGGCTC	XhoI
22	HspBP1endNot	ATAGGGCCGCTCACCGATCCATGCTGTCG	NotI

BAG-1/HspBP1		
23	5-HspBP1-A137R	GTGTGAGAACATGGACAATCGGCAGACTTCTGCCAGCTG
24	5-HspBP1-K249A	GGTGAGAAAGCTCAAGGTGCCTCAGCATTCTGTCTGCAG
25	3-HspBP1-A137R	CAGCTGGCAGAAAGTCTGCCCGATTGTCCATGTTCTCACAC
26	3-HspBP1-K249A	CTGCAGCAGGAATGCTGAGGGACCTTGAGCTTCTGCACC
27	mMR/mGR	
28	5-mMRfor	ATGGAACCAAAAGGCTACCACAG
29	3-mMR rev	TCACTTCCTGTGAAAGTAAAGGGGC
30	5-EagI_mMR	AATTCGGCCGATGGAACCAAAAGGCTACCACAG
31	3-mMR_XhoI	ATTCTCGAGTCACTTCCTGTGAAAGTAAAGGGGC
32	5-mMR1289	GTACCAATAAAGCAAGAGTCAAGCAAGCACTCATGTTC
33	5-mMR1902	CAAAAGAGCCGTGGAAGGACCAACACACTATCTGTGTG
34	5-mMR2149	AGGAGCCATCAGTGAAGTCTGCGTGGTCCCGCAGCTC
35	5-mMR2913	TGCCAAAGGTGGAATCCGGGAACGCCAAAGCCCTTTAC
36	5-mGRLBD	ACCCTGGTCACTGCTGGAGG
37	3-mMRGRLBD	CACCTCCAGCAGTGACACCAGGGTTGGCGTAGCGCCGCTGATCG
38	5-mGR_XhoI	TATTA CTCGAGATGGACTCCAAAGAATCCTTAG
39	3-mGR_NotI	AAAGCGCCGCTCATTCTGATGAAACAGAAAGCTTTTG
40	5-mMR_XhoI	TATTACTCGAGATGGAAACCAAAAGGCTACCAC
41	3-mMR_NotI	AAAGCGCCGCTCACTTCCTGTGAAAGTAAAGGG
42	5-mGRLBD	ACCCTGGTCACTGCTGGAGG
43	5-Flag-mMR_XhoI	TATTA CTCGAGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGAAACCAAAAGGCTACCAC
44	5-Flag-mGR_XhoI	TATTA CTCGAGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGACTCCAAAGAATCCTTAG
45	5-mMR-Q772E	CAACCCGCTGGCGGCAAGGAGATGATCCAAGTCGTGAAGTGG
46	3-mMR-Q772E	CCACTTCACGACTTGGATCATCTCTTGCCTCCCGCCAGGCGGTTG
47	5-mMR-S811G	GTGTCTATCATCGTTTGCCTTGGTTGGAGATCGTACAAACATAC
48	3-mMR-S811G	GTATGTTGTACGATCTCCAACCCAAAGGCAACCGATGATAGACAC

Die entsprechenden Restriktionsstellen (RE) sind in den jeweiligen Primersequenzen unterstrichen.

2.10 Kits, Geräte, Apparaturen und Software

2.10.1 Kits

Bezeichnung:	Verwendung:	Hersteller:
BCA-Kit	Proteinbestimmung	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
EZ-PCR Mycoplasma Test Kit	Mycoplasmen-Test	Biological Industries, Beit Haemek, Israel
E.N.Z.A. Plasmid Minipreparation	DNA-Isolierung	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Nucleobond AX 2000	DNA-Isolierung	Macherey-Nagel
PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit, Far Red	Polarisationsexperiment (Messung der Hormonbindung des GR)	Invitrogen, USA
QuikChange Site-Directed mutagenesis	Mutagenese von Plasmid-DNA	Stratagene, Amsterdam
QuikChange Multi Site-Directed mutagenesis	Mutagenese von Plasmid-DNA	Stratagene, Amsterdam
QIAquick Gel Extraction	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Reinigung von DNA-Fragmenten	Qiagen, Hilden
TRIZOL	RNA-Isolierung	Invitrogen, Karlsruhe

2.10.2 Geräte und Apparaturen

Gerät:	Bezeichnung/Typ:	Hersteller:
Agarosegel-Elektrophoresekammern:		BioRad, München
Bioruptor		Diagenode, Liège, Belgien
Brutschränke:		Binder, Tuttlingen; Heraeus, Mannheim
Concentrator	5301	Eppendorf, Hamburg
Dounce-Homogenisator 2ml (Glas)		Sartorius, Göttingen
Elektroporator:	Gene Pulser II Capacitance extender Plus	BioRad, München
Heizblock:	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Imaging-System:	Image Station 440 CF	Kodak, USA
Luminometer/ Fluorometer:	Tristar LB 941 Victor2 GENios Pro (incl. Software)	Berthold; Bad Wildbach Wallac, Finnland Tecan, Crailsheim
Mikrotiterplatten-Lesegerät:	MR 7000	Dynatech, Denkendorf
PCR-Maschinen:	T Gradient; Primus 25 advanced; DNA-Engine PTC-200	Biometra, Göttingen; PiqLab, Erlangen; Biozym, Oldendorf
Power Pac 300 / 200:		BioRad, München
Rotamix Überkopf-Schüttler:		ELMI, Lativa
Scanner/Densitometer:	GS-800 calibrated Densitometer	BioRad, München
Scintillation Counter	LS 6500	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttler:	DuoMax 1030; Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
SDS-Gelelektrophoresekammern:	Mini-Protean 3	BioRad, München
Spektrophotometer:	DU 640	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator		Stratagene, Amsterdam
Vortex Genie 2:		Scientific Industries

		Vertrieb: Roth, Karlsruhe
Waage	Voyager 50187	Ohaus, Giessen
Wasserbäder:		Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Western Transfer- Apparatur:	Mini Trans Blot Cell	BioRad, München
Zentrifugen:	Heraeus Biofuge pico; Eppendorf 5417R (Kühlzentrifuge); Beckman Allegra X22R (Rotor: SX4250); Beckman J2-MC (Rotor: JA- 14); Beckman Allegra 21 ; Ultrazentrifuge (Rotor: SW60)	Haereus, Mannheim; Eppendorf, Hamburg; Beckman Coulter, Krefeld

2.10.3 Software

• 1D Image Analysis Software 3.6:	Quantifizierung der Western Blots	Kodak, USA
• PDQuest :	Scannen der Coomassie-Gele	BioRad, München
• SigmaPlot	Anpassung der Bindungskurven, L ₅₀ -Berechnung	Systac Software Inc (www.sigmaplot.com)
• Vector NTI 10:	Sequenzanalyse von Oligos, DNA und Proteinen; Archivierung	Invitrogen, Karlsruhe

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Bei allen hier verwendeten Zelllinien (vergleiche Kapitel 1.6.1) handelte es sich um adhärenzte Zellen, die in sterilen 75 cm² bzw. 150 cm² Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% FBS, 1% Antibiotikum und 1% Pyruvat. Alle Zellen wurden in einem 37°C-CO₂-Brutschrank (Heraeus) mit 5% CO₂ kultiviert. Sobald ein dichter Zellrasen (Konfluenz) erreicht wurde, erfolgte die Passage der Zellen. Je nach Zelltyp variierte diese vom Verhältnis 1:4 und 1:6 (SK-N-MC; HEK 293) bis zu 1:7 und 1:9 (Cos-7, Neuro-2A). Nach der Entfernung des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit 5 ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 ml Trypsin pro 75 cm² Flasche bzw. 3 ml pro 150 cm² Flasche für 2 min. im Brutschrank inkubiert, um den Zellrasen vom Flaschenboden abzulösen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml bzw. 5 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen in ein steriles Falcon überführt und bei Raumtemperatur mit 180 x g für 4 min. zentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden je nach Verdünnungsfaktor in frischem Medium resuspendiert und auf Flächen mit vorgelegtem Medium verteilt.

3.1.2 Dauerhafte Lagerung und Inkulturnahme

Lösungen: Einfriermedium: 54,5% DMEM-Medium, 36,4% FBS, 9,1% DMSO

Das Einfriermedium wurde immer frisch hergestellt.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte im Stickstofftank. Die Zellen einer konfluenten Flasche wurden präzipitiert, anschließend in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um Schäden durch spätere Kristallbildung zu vermeiden, wurden die Zellen erst bei -80°C gelagert und erst zwei bis drei Tage später in flüssigen Stickstoff überführt.

Werden eingefrorene Zellen wieder in Kultur genommen, muss das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt werden. Die Zellen wurden schnell und somit schonend im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Entfernung des Einfriermediums erfolgte durch einen Waschschrift mit vorgewärmtem Kulturmedium. Nach der Zentrifugation (180 x g/ 4 min) und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in frischem DMEM resuspendiert und in eine frische Zellkultur-Flasche überführt. Falls die Zellen nach zwei Tagen noch nicht vollständig dicht waren, wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Sobald die Zellen 100% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für ca. drei Tage im 1:2 Rhythmus

passagiert. Anschließend erfolgte die regelmäßige Passage zweimal pro Woche. Abhängig vom Zelltyp kann es unter Umständen eine bis zwei Wochen dauern, bis sich die Zellen erholt haben.

3.1.3 Herstellung von steroidfreiem FBS

a) Herstellung der Aktivkohle Dextran T70 Mischung

50 g Aktivkohle wurden mit 500 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8 langsam 10 min. verrührt bis eine homogene Suspension entstand. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde die Aktivkohle erneut mit 500 ml 10mM Tris-HCl pH 7,8 versetzt und der eben beschriebene Prozess wiederholt. Nach erneutem Dekantieren des Überstands wurden 5 g Dextran T70 und 400 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8 zugegeben. Das Aktivkohle-Dextran T70 Gemisch wurde autoklaviert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

b) Herstellung des steroidfreien FBS

Es wurden 500 ml aufgetautes FBS mit 25g AG1-X8 „Resin“ versetzt und über Nacht bei 4°C langsam gemischt. Am nächsten Tag wurde das FBS dekantiert, in ein frisches Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 ml der Aktivkohle-Dextran T70 Mischung wurde erneut über Nacht bei 4°C durch langsames Rühren gemischt. Das FBS-Kohle-Dextran Gemisch wurde am nächsten Tag bei 4°C und 153 x g zentrifugiert und durch einen Faltpfilter vorgereinigt. Anschließend wurde das FBS mittels Vorfilter steril filtriert und 50 ml weise aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das steroidfreie FBS bei -20°C gelagert.

3.1.4 Herstellung von Trypsin und PBS

Es wurden 100 ml 10x Trypsin-EDTA mit 100 ml phenolrothaltigem 10x HBSS gemischt und mit endotoxinfreiem ddH₂O auf 1000 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung von 500 ml 1xPBS wurden 50 ml 10x PBS mit ddH₂O auf 500 ml Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das 1x PBS bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.5 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose, extra- oder intrazelluläre Bakterien, die eine der häufigsten Kontaminationen von Zellkulturen darstellen. Mycoplasmen greifen nicht nur in den Stoffwechsel der Zellen und somit in das Wachstum von eukaryontischen Zellen ein, sondern führen ebenfalls zu morphologischen Veränderungen. Eine Mycoplasmeninfektion kann zu starken experimentellen Schwankungen führen, weshalb sich eine regelmäßige Kontrolle der Zellen empfiehlt.

a) Zellbiologischer Nachweis von Mycoplasmen

Lösungen: Bisbenzimid: 1 mg/ml in ddH₂O
MetOH

Arbeitslösung: 10 µg/ml Bisbenzimid in MetOH

Der Mycoplasmen-Nachweis erfolgt hier durch Anfärben sowohl pro- als auch eukaryotischer DNA durch den Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid. Hierfür wurden die Zellen in 60 cm²-Schalen ausgesät und bis zu einer Dichte von 40-60% kultiviert. Nach der Entfernung des verbrauchten Mediums wurden die Zellen erst mit 5 ml Arbeitslösung pro Schale gewaschen und anschließend mit weiteren 5ml Arbeitslösung pro Schale 15 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Entfernung der Bisbenzimidlösung und Trocknung der Platte konnte die angefärbte DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und Ölimmersionsobjektives sichtbar gemacht werden. Die maximale Anregung von Bisbenzimid liegt bei 356 nm, die Emission bei 458 nm. Eine Mycoplasmeninfektion erkennt man daran, dass neben der klar abgegrenzten Zellkernfluoreszenz auch das Zytoplasma bzw. äußere Bereiche gefärbt sind. Die Mycoplasmen-DNA fluoresziert meistens in einer Art „Perlschnur“-Optik, die die einzelnen Zellkerne miteinander zu verbinden scheint. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eine sehr starke Mycoplasmeninfektion vorliegen muss, um diese „Perlschnur“-Fluoreszenz beobachten zu können. In diesem Stadium weisen die Zellen bereits eine deutlich reduzierte Wachstumsrate auf.

b) Molekularbiologischer Nachweis von Mycoplasmen

Die weitaus sensitivere Methode ist ein Nachweis der Mycoplasmen mittels PCR. Hierfür wurde der „EZ-PCR Mycoplasma Test Kit“ verwendet. Als Template wird Kulturmedium in die Reaktion eingesetzt. Die Primer-Mischung erlaubt die Detektion von 12 verschiedenen Mykoplasmen-Arten sowie die Detektion von *Acholeplasma* und *Spiroplasma*. Die PCR wurde wie im Handbuch des Herstellers empfohlen durchgeführt.

3.1.6 Transfektion von Säugetierzellen

a) Elektroporation

<u>Lösungen:</u>	Elektroporationspuffer pH 7,35:	50 mM K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O;
		20 mM Kaliumacetat
	Magnesiumsulfat pH 6,7:	1M MgSO ₄ (pH mit NaOH einstellen)

Beide Lösungen wurden autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Elektroporation ist eine „Methode zur Erzeugung von Löchern in biologischen Membranen, um DNA in lebende Zellen einzuschleusen. Durch die Pulse eines sich entladenden Kondensators wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, das in Zellwänden Löcher hervorruft, die sich sofort wieder schließen. Fremd-DNA kann durch diese Öffnungen [...] in Säugetierzellen eingeführt werden.“¹ Je nach Experiment wurden HEK 239 Zellen 1:4 gesplittet und in der entsprechenden Anzahl an 60 cm² oder 150 cm² Schalen in steroidfreiem Medium ausgesät. Für die Elektroporation wurden die 95-100% konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden pro 60 cm² Schale in 390 µl Elektroporationspuffer mit 10 µl MgSO₄ resuspendiert. Bei mehreren Schalen empfiehlt es sich, einen Mastermix aus Elektroporationspuffer und MgSO₄ herzustellen und die gesamten Zellen im entsprechenden Volumen aufzunehmen. Bei unterschiedlichen Ansätzen eines Experiments wurden jeweils 400 µl der Zellsuspension auf sterile 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt und die entsprechende Menge Plasmid-DNA (max. 10 µg/60 cm² Schale) zugegeben. Die Zellen wurden sanft gevortext und anschließend ansatzweise in die Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte mit 350 V und 700 µF. Wird mit 150 cm² Schalen gearbeitet, so entsprechen zwei 150 cm² Schalen jeweils fünf 60 cm² Schalen. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 60 cm² Schalen mit frischem und vorgewärmten steroidfreiem Medium überführt und für 62-68 h im Brutschrank inkubiert. Je nach Konstitution der Zellen haben sie nach der ca. dreitägigen Ruhephase eine Dichte von 85-95% erreicht.

¹ (<http://www.biosicherheit.de/de/lexikon/123.elektroporation.html>)

b) Kationisches, polymeres Transfektionsreagenz

Lösungen: *NaCl*: 150 mM, autoklaviert
 ExGen 500

"ExGen 500" ist ein lineares Polyethylenimin-Derivat von 22kDa und erlaubt das nicht-virale, nicht-liposomale Einschleusen von Fremd-DNA in eine Vielzahl von Zelllinien. Das Polymer besitzt eine hohe kationische Ladungsdichte und bildet durch ionische Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrad der DNA 50 nm große Partikel. Diese Komplexe lagern sich an der Zelloberfläche an und werden durch Endozytose aufgenommen. Bei jedem dritten Atom des ExGen 500-Rückgrats handelt es sich um einen protonierbaren Aminostickstoff, somit kann der Komplex den niederen pH-Wert der Endosomen puffern und erleichtert dadurch deren „Aufbrechen“. Die Abgabe des ExGen 500-DNA-Komplexes ins Zytoplasma findet somit vor einem lysosomalen Abbau der DNA statt. Die Fitness der Zellen und daher auch die Transfektionseffizienz hängen von der Zellzahl, der verwendeten DNA-Menge sowie dem Verhältnis von ExGen zu DNA ab, d.h. von der Anzahl der sogenannten Äquivalente ExGen (siehe Handbuch des Herstellers).

Diese Methode der Transfektion wurde für die Reporter-Gen-Experimente im 96-well Format verwendet. Es wurde für jeden Zelltyp die optimale Anzahl der ExGen-Äquivalente bestimmt. Empfehlungen für die zu verwendenden DNA-Mengen und NaCl-Volumina zur Transfektion verschiedener Zellkulturschalenformate sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

Für einen Reaktionsansatz pro 96-Well wurden die Plasmide in 150 mM NaCl aufgenommen und sanft gemischt, mit der entsprechenden Menge ExGen versetzt und durch starkes Vortexen 10 sek. gemischt. Das Endvolumen pro Well betrug 10 µl. Anschließend erfolgte ein 10-15 minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 90 µl vorgewärmten steroidfreien DMEM-Mediums und erneutem sanftem Mischen wurden die Zellen eines Wells mit dem gesamten Transfektionsansatz von 100 µl transfiziert. Da immer mehr Wells pro 96-Well Platte transfiziert werden, erleichtert dies die Handhabung, da mit Mastermixen gearbeitet werden kann. Die verwendeten Volumina an DNA, NaCl, ExGen und Medium können nach Angaben des Herstellers, entsprechend an die Anzahl zu transfizierender Wells angepasst werden. Abschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt der 96-Well Platte mit 280 x g bei Raumtemperatur für 5 min.. Die zu verwendende Menge ExGen ergibt sich aus folgenden Formeln (s. Handbuch des Herstellers):

$$Z = 3 \times n / 5,47$$
$$\mu\text{l ExGen} = \mu\text{g DNA} \times Z$$
$$n = \text{Äquivalente ExGen}$$

Im Allgemeinen entspricht das Volumen NaCl inklusive aller Plasmide und der entsprechenden Menge ExGen pro Well 1/10 Volumen des Transfektionsvolumens.

3.1.7 Reportergergen-Experimente

<u>Lösungen:</u>	passiv Lysis-Puffer: 100 mM K ₃ PO ₄ ; pH 7,8, 0,2% Triton X-100
	2x Renilla-Puffer: 2, 2 M NaCl, 4, 4 mM EDTA, 0, 22 M K ₃ PO ₄ ; pH 5, 1, 0, 88 mg/ml BSA
	Gaussia-Puffer: 0, 22 M K ₃ PO ₄ ; pH 5, 1,
	D-Luciferin: 10 mM in K ₃ PO ₄ , pH 7, 8 und Methanol
	Coelenterazin: 1 mg/ml in EtOH + HCl (5 mM)
	MgCl ₂ : 0, 1 M
	ATP: 0, 1 M
	Fireflylösung: 5 mM MgCl ₂ , 2 mM ATP, 100 µM D-Luciferin
	Gaussialösung: (1ml): 500 µl 2x Renilla-Puffer, 500 µl Gaussia-Puffer, 2, 5µl Coelenterazin

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann mittels Reportergergen-Experimente bestimmt werden. Hierbei wird die Expression oder Aktivität sogenannter Reportergergene gemessen. Diese Reportergergene werden von Promotoren getrieben, die entweder natürliche oder artifizielle Bindungstellen für diese Transkriptionsfaktoren besitzen. Je aktiver der Transkriptionsfaktor ist, je höher ist die Transkriptions- und somit die Expressionsrate des Reportergergens.

Als Reporter wurde die Luciferase von *Photinus pyralis* (*Firefly*) unter Kontrolle eines MMTV-Promotors verwendet. Dieses Enzym katalysiert ATP-abhängig die oxidative Decarboxylierung von D-Luciferin zu Oxoluciferin unter Emission von Licht. Magnesium wird als Cofaktor benötigt. Herrscht Substratsättigung, ist die enzymatische Aktivität proportional zur gebildeten Menge des Enzyms und somit zur Aktivität des Transkriptionsfaktors.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Luciferase von *Gaussia princeps* unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors cotransfiziert. Das Substrat der *Gaussia*-Luciferase ist Coelenterazin, welches mittels Sauerstoff zu CO₂ und Coelentamid umgesetzt wird, ebenfalls unter Lichtemission. Beide Enzyme wurden im selben Extrakt, dual, gemessen.

Die Anzahl der ausgesäten Zellen pro Well ist abhängig von der Zelllinie, deren Größe und aktueller Wachstumsrate. Die Anzahl der ExGen-Äquivalente wurde für jede Zelllinie ermittelt. In dieser Arbeit wurden folgende Zellzahlen und Äquivalente ExGen verwendet (Tab. 2).

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien, Anzahl der Zellen pro 96-Well und Äquivalente ExGen für die Reporter-Experimente

Zelllinie	Zellzahl / Well	ExGen-Äquivalente
Cos-7	8000	6
HEK 293	30000	6
SK-N-MC	60000	8
Neuro-2A	10000	8

Die Zellen wurden in steroidfreiem DMEM-Medium in einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert. Für eine optimale Transfektionseffizienz sollten die Zellen eine Dichte zwischen 50 und 70% aufweisen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion. Weitere 23-24 h später wurden die Zellen lysiert und die Aktivitäten der beiden Luciferasen gemessen.

Die Lyse der Zellen erfolgte mit 50 µl passiv Lysis-Puffer pro Well. Für eine effizientere Lyse wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min. bei 500 rpm geschüttelt. Für die Messung der Lumineszenz wurden 10 µl Zellextrakt verwendet. Die Luciferase-Aktivitäten wurden nacheinander nach Injektion von 50 µl Fireflylösung bzw. Gaussia-Lösung gemessen. Zuerst wurde die Enzymaktivität der *Firefly*-Luciferase anschließend die der *Gaussia*-Luciferase detektiert. Die Duale-Messung wird durch die verschiedenen pH-Optima der beiden Enzyme möglich. Die *Firefly*-Luciferase ist im schwach alkalischen Milieu aktiv, die *Gaussia* im sauren. Durch Zugabe der *Gaussia*-Lösung wird die *Firefly*-Luciferase inaktiviert.

Es wurden pro Well standardisiert 5 ng *Gaussia*-Plasmid verwendet und 60 ng MMTV-Luciferase-Plasmid für die humanen SR. Für die Aktivitäts-Bestimmung der murinen SR wurden 40 ng MMTV-Luciferase-Plasmid pro Well cotransfiziert.

Die Messungen erfolgten in Triplikaten, die für die anschließende Westernblot-Analyse vereinigt wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsniveaus der verschiedenen Rezeptoren wurden die Proben wie unter a-c) beschrieben für die Westernblot-Analyse (siehe 2.2.4) der Rezeptoren vorbereitet.

Für die Auswertung der Messung wurden die Luciferase-Werte auf die *Gaussia*-Werte normalisiert. Diese Werte stellen die relative Rezeptor-Aktivität dar und wurden für weitere Berechnungen verwendet. Das Verhältnis der stimulierten Werte zu den nicht stimulierten Werten (Hormon/Ethanol) gibt Auskunft über die Rezeptor-Dynamik. Wurde der Einfluss von Cofaktoren auf die Aktivität von SR untersucht, wurde der Wert der Kontrolle, der die maximale Stimulierung repräsentierte, auf 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden anschließend auf diesen Wert bezogen. Auf diese Weise wurde der Einfluss der Cofaktoren auf die Rezeptor-Aktivität ermittelt.

a) Vorbereitung der Proben für die GR und PR-Detektion:

Es wurden jeweils 30 µl pro Well der entsprechenden Triplikate vereinigt. Nach der Zugabe von 25 µl 5x Lämmli-Auftragspuffer wurden die Proben für 5 min. bei 95°C erhitzt. Für die Westernblot-Analyse wurden 20 µl Probe geladen.

b) Vorbereitung der Proben für die MR-Detektion:

Die entsprechenden Triplikate wurden mit 30 µl pro Well vereinigt und im Concentrator 30 min. bei 30°C einrotiert. Von diesen Proben wurden 30 µl Überstand abgenommen und mit 10 µl 5x Lämmli-Auftragspuffer für 5 min. bei 95°C denaturiert. Im Anschluss wurden je 15 µl Probe für die immunologische Analyse im Westernblot auf ein PAA-Gel geladen.

c) Vorbereitung der Proben für die AR-Detektion:

Die Triplikate wurden in gleicher Weise wie in b) mit 30 µl pro Well vereinigt und mittels Zentrifugation konzentriert. Ausgehend von einem 50 µl Endvolumen wurden 6,5 µl 20% SDS zugegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Sonifizierung der Proben (8x 30 sek. Stufe 5, Bioruptor), um die Kerne vollständig aufzuschließen und die DNA zu fragmentieren. Danach wurden die Proben mit 15 µl 5xLämmli-Auftragspuffer versetzt und bei 90°C für 15 min. denaturiert. Für die Analyse im Westernblot wurden 20 µl Probe auf ein PAA-Gel geladen.

3.2 Mikrobiologische Standardmethoden

3.2.1 Herstellung von Nährmedien und Agar-Platten

<u>Lösungen:</u>	Ampicillin-Stocklsg.:	50 mg/ml	Endkonz.: 100 µg/ml
	Kanamycin- Stocklsg.:	50 mg/ml	Endkonz.: 50 µg/ml

Die Stock-Lösungen wurden steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für einen Liter LB-Medium wurden 20 g LB Broth Base in einem Liter ddH₂O gelöst und autoklaviert. Vor dem Animpfen einer 400 ml Bakterienkultur wurde die entsprechend Menge der gewünschten Antibiotikum-Stocklsg. beigefügt. Für die Herstellung von LB_{Antibiotikum}-Agar-Platten wurden 16 g Agar in einem Liter LB-Medium autoklaviert. Anschließend wurde der Agar im Wasserbad auf 60°C gekühlt, die gewünschte Menge Antibiotikum-Stocklsg. hinzugegeben und in Petrischalen gegossen.

3.2.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Abhängig vom Verwendungszweck wurden die Bakterien unterschiedlich kultiviert. Für Klonierungen wurden nach der Transformation (siehe 3.2.3) 200 µl und Rest auf LB_{Antibiotikum}-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Herstellung einer Übernachtskultur (ÜK) für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 6ml LB_{Antibiotikum} -Medium in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit einer Einzelkolonie (EK) inokuliert und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf einem Bakterenschüttler inkubiert.

Die Anzucht einer 400 ml ÜK im Erlenmeyerkolben für die Plasmid-Mega-Präparation erfolgte entweder mit 150-250 µl der „Mini“-ÜK oder einer Vorkultur (VK) aus einer Glycerinkultur. Zur Herstellung der VK wurden 1 ml LB_{Antibiotikum} -Medium in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit Glycerinkultur angeimpft und anschließend bei 37°C und 700-800 rpm auf dem Heizblock für 8-10 h geschüttelt. Für die Inokulation der 400 ml LB_{Antibiotikum} -Medium wurde die gesamte VK verwendet.

Zur Herstellung einer Glycerinkultur wurden 500 µl LB-Medium mit 50% Glycerin, in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, und anschließend mit 1 ml ÜK gemischt. Alternativ, abhängig von der Dichte der ÜK, wurden 5ml ÜK bei 1734 x g 10 min. zentrifugiert, in 1 ml LB_{Antibiotikum} resuspendiert und ebenfalls in ein 2ml Reaktionsgefäß mit 500µl LB-Medium und 50% Glycerin überführt. Die dauerhafte Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Lösungen: Tfb I pH 5,8: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂,
50 mM Manganchlorid, 15% Glycerin
Tfb II pH 6,5: 10 mM NaMops; 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl,
15% Glycerin

Beide Lösungen wurden steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Herstellung kann bis zu drei Tagen dauern. DH5α Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB-Medium mit einer EK des Ausstriches angeimpft. Alternativ kann man auch 10 µl kompetente Zellen verwenden. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm für 12-16 h geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 400 ml LB-Medium mit der gesamten 5 ml ÜK inokuliert und wiederum bei 37°C geschüttelt bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,48 erreicht war. Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Nachdem die gewünschte optische Dichte erreicht war, wurden die Bakterien 5 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 4°C und 1381 x g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die präzipitierten Bakterien wurde in 80 ml TfbI-Puffer resuspendiert und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem Inkubationsschritt von 5 min. auf Eis, wurde die Bakteriensuspension erneut bei 4°C und 1734 x g für weitere 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und die Bakterienzellen jeweils in 8 ml Tfb II-Puffer aufgenommen. Nach weiteren 15 min. auf Eis wurde die Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße à 200 µl aliquotiert. Die einzelnen Aliquots wurden mittels Trockeneis in einem Ethanol-Bad schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Hitzeschock Transformation von *E. coli*

Die chemisch kompetenten DH5α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl Bakterien wurde der Transformationsansatz 30 min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 sek bei 42°C im Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nach zehn-minütiger Inkubation wurden 900 µl SOC Medium zugesetzt und der gesamte Ansatz 1 h bei 700-800 rpm auf dem 37°C erwärmten Heizblock geschüttelt. Je nach Bedarf wurden nun 400 ml LB_{Antibiotikum} – Medium mit dem gesamten Transformationsansatz für eine Plasmid-Mega-Präparation angeimpft. Im Falle einer Klonierung wurden 200 µl und Rest auf LB_{Antibiotikum}-Agar-Platten ausplattiert. Beide Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die 400 ml Kultur wurden bei 200 rpm geschüttelt um die Bakterienkultur mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen.

3.3 DNA-Analytik

3.3.1 Plasmidpräparation

a) Mega-Präparation mittels Nucleo Bond AX-Kit

<u>Lösungen:</u>	S1 -Puffer, pH 8, 0: 50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0, RNase A 100 µg/ml
	S2 -Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS
	S3 -Puffer pH 5, 1: 2800 mM Kaliumacetat
	N2 -Puffer, pH 6, 3: 100 mM Tris, 900 mM KCl, 15% EtOH, 0, 15% Triton X-100
	N3 -Puffer pH 6, 3: 100 mM Tris, 1150 mM KCl, 15% EtOH
	N5 -Puffer pH 8, 5: 100 mM Tris, 1000 mM KCl, 15% EtOH
	Ethanol: 70%
	TE-Puffer pH 7,5-8: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0

Für die Isolierung großer DNA-Mengen von hoher Reinheit wurde der Nucleobond AX Kit verwendet.

Die Plasmidisolierung erfolgte aus einer 400 ml ÜK nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Bakterien wurden mit 1381 x g für 15 min bei 4°C geerntet. Anschließend wurden sie in 45 ml S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 45 ml S2-Puffer erfolgte die alkalische Lyse. Die Neutralisation und Fällung der Proteine wurde mit 45 ml S3-Puffer erreicht. Nach der Abtrennung von Proteinen und chromosomaler DNA bei 15344 x g und 4°C für 50 min. wurde der Überstand über einen Vorfilter auf AX-2000 Säulen geladen, die vorher mit 20 ml N2-Puffer equilibriert wurden. Es folgten zwei Waschschriffe mit 35 ml N3-Puffer. Die Elution der DNA fand mit 25 ml N5-Puffer statt. Die Fällung der Plasmid-DNA durch 18 ml Isopropanol erfolgte mit 3901 x g, bei 4°C für 1 h. Nach einem zusätzlichen 30 minütigen Waschschriff mit 7 ml 70% Ethanol bei Raumtemperatur und 3901 x g, wurde die gefällte Plasmid-DNA luftgetrocknet, in TE-Puffer gelöst und die Konzentration bestimmt.

b) Plasmid Mini-Präparation mittels E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit

Eine schnelle Methode der Plasmidisolierung im kleinen Maßstab bot der „E.N.Z.A.Plasmid Miniprep Kit“ von PEQLAB. Die DNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

c) Plasmid Mini-Präparation manuell

Die manuelle Methode der Plasmidisolierung lieferte eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA. Es wurden die gleichen Puffer verwendet wie für die Mega-Plasmid-Präparation (s. 2.3.1 a)

Es wurden 5 ml $\text{LB}_{\text{Antibiotikum}}$ -Medium mit einer EK inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Für die Plasmidisolierung wurden 1,5 ml bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 1 ml S1-Puffer ohne RNase A gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in 200 µl S1-Puffer mit RNase A resuspendiert, mit 200 µl S2-Puffer lysiert und durch fünf-minütige Inkubation auf Eis nach Zugabe von 200 µl S3-Puffer neutralisiert. Die Abtrennung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Heraeus, Biofuge pico) für 15-30 min. Der Überstand wurde in ein frisches, autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA-Fällung erfolgte mit dem 0,8-fachen Volumen Isopropanol für 10-20 min. bei 13000 rpm (Heraeus, Biofuge pico) und Raumtemperatur. Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes wurde die DNA nach dem Lufttrocknen in 50-100 µl autoklaviertem ddH₂O gelöst.

3.3.2 DNA-Fällung mit Natriumacetat

Lösungen: 3 M Natriumacetat pH 5.2
 100% Ethanol
 70% Ethanol

Die DNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol zugegeben, gemischt und der Ansatz wurde ca. 30 min bei -80°C gelagert. Nach einem 20-minütigem Zentrifugationsschritt bei 25000 x g und 4°C wurde der Überstand entfernt, gefolgt von einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol ebenfalls bei 25000 x g, bei 4°C für 10 min. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die DNA luftgetrocknet und im gewünschten Volumen autoklavierten ddH₂O gelöst.

3.3.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei einer Wellenlänge von 260 nm weisen DNA-Lösungen eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion auf, die nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration ist.

$$E = \epsilon * c * d \quad (\text{Lambert-Beer'sches Gesetz})$$

E = Extinktion

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm gab Auskunft über den Grad der Verunreinigung durch Proteine. Für die Messungen wurde eine Quarzküvette verwendet. Die zu messende Lösung wurde so verdünnt, dass sich die Extinktion oder die OD₂₆₀ im linearen Messbereich von 0,1-0,9 befand. Anhand des folgenden Verhältnisses kann die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt werden.

Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA, 40 µg/ml RNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA (ss).

Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte im idealen Fall zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Kontrolle oder bei sehr geringen DNA-Konzentrationen kann eine bestimmte Menge der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen werden und anhand der Intensität mit einer Referenzbande des Standards bekannter Menge verglichen werden.

3.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen mit TRIZOL

Lösungen: TRIZOL-Reagenz
Chloroform
Isopropanol
Ethanol 75%
RNase freies H₂O

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte aus einer 60 cm²-Schale mit 100% konfluenten HT22-Zellen. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 ml TRIZOL lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zu gegeben und gut gemischt. Nach weiteren 2-3 min. Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und 4°C für 15 min. Die

Zentrifugation bewirkt eine Phasentrennung. Unten im Reaktionsgefäß befindet sich eine rote Phenol-Chloroformphase gefolgt von einer trüben Interphase. Als letzte Schicht ganz oben befindet sich die wässrige Phase. Sie ist farblos und beinhaltet die isolierte RNA. Diese Phase wurde in ein frisches autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und gut gemischt. Einer zehn-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Fällung der RNA mit 12.000 x g bei 4°C für 10 min. Nach Entfernung des Überstandes folgte ein Waschschriff mit 75% Ethanol bei 7.500 x g und 4°C für weitere 5 min. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das RNA-Präzipitat luftgetrocknet und im gewünschten Volumen RNase freiem H₂O gelöst.

3.3.5 Reverse Transkription

Vor der cDNA-Synthese wurde die isolierte mRNA 10 min. bei 60°C denaturiert. Für die reverse Transkription wurden 5 µg mRNA, 1/10 Volumen 10x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs, 100 pmol Oligo-dT-Primer (T₁₈), 10 U RNAsin und 200 U reverse Transkriptase eingesetzt. Die Reaktion fand in einem Endvolumen von 20 µl statt.

3.3.6 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht, kleinste Mengen DNA auf arbeitsrelevante Maßstäbe zu amplifizieren. Es werden zwei Oligonukleotide benötigt, die den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren und spezifisch daran binden. Die Amplifikation erfolgte mit thermostabilen 5' → 3' DNA-Polymerasen. Für Klonierungen die ein hohes Maß an Genauigkeit verlangen, wurden entweder die *Pwo*- oder *Pfu turbo*-Polymerase eingesetzt. Beide Enzyme besitzen eine sogenannte „*Proofreading*“-Aktivität, wodurch sie eine geringere Fehlerrate haben als die herkömmliche *Taq*-Polymerase. Für beide Enzyme wurde als Template Plasmid-DNA verwendet. Eine weitere, für die Amplifikation der HA-PR-Konstrukte verwendete Polymerase ist die *Herculase II Fusion*. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine *Pfu turbo*-Polymerase die mit einer ds-DNA bindenden Domäne fusioniert wurde. Diese DNA-Polymerase wurde für die Amplifikation besonders GC-reicher DNA-Sequenzen verwendet.

Für Amplifikationen aus der cDNA wurde die *PicoMaxx* eingesetzt, eine Mischung aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase. Mit dieser Mischung konnte die Volllänge des murinen MR aus HT22-cDNA amplifiziert werden (s. 2.3.6d). Die *Taq*-Polymerase wurde für Kontrollreaktionen benutzt, hierbei war die Fehlerrate irrelevant, da die amplifizierten Produkte nicht weiter verarbeitet wurden.

a) Standard-PCR

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem 50 µl Endvolumen nach folgendem Schema durchgeführt:

5 µl	10x Polymerasepuffer
10 pmol	Primer 1
10 pmol	Primer 2
200 µM	dNTP-Mix
1-50 ng	DNA-Template
2.5 U	Polymerase
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die Menge DNA-Template bewegte sich zwischen 10-50 ng, mit Ausnahme der Reaktionen mit der *Pfu-turbo*. Für dieses Enzym erwies sich 1-5 ng DNA-Template als optimal. Die Anzahl der jeweiligen Zyklen und verschiedenen Temperaturschritte einer Standard-PCR-Reaktion sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle. 3: Standardisierte PCR-Reaktion zur DNA-Amplifikation von verschiedenen Templaten

	Plasmid-DNA
1. Denaturierung	
2. reguläre Denaturierung	94°C / 45 sek.
Annealing	max. 63°C / 45 sek.
Elongation	abhängig von Fragmentgröße, 68°C bzw. 72°C
Letzte Elongation	4-7 min. / 72°C
Zyklen	30

Die Annealing-Zeit betrug in der Regel 45 Sekunden, die Temperatur wurde jeweils an das entsprechende Primer-Paar angepasst. Zur Ermittlung der Annealingtemperatur wurden die Primersequenzen mit dem Programm VectorNTI analysiert. Für die PCR-Reaktion wurde von der errechneten Temperatur noch 3°C abgezogen. Die maximale Annealingtemperatur betrug 63°C. Beim Anfügen von Schnittstellen oder „Epitopen“ wurden die ersten fünf Zyklen mit einer niedrigeren Annealingtemperatur vollzogen, entsprechend der Temperatur für die komplementären Bereiche. Für die weiteren 25 Zyklen wurde die höhere Temperatur, entsprechend der gesamten Primersequenz, gewählt.

Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Das Temperaturoptimum für die Elongation wurde dem Handbuch des Herstellers entnommen. Es liegt in der Regel bei 72°C, mit einer Ausnahme, abhängig von der Fragmentgröße kann das Temperaturoptimum der *Pfu turbo* bei 68°C liegen.

b) PCR für die Klonierung der HA-PR-Mutanten

Alle Konstrukte der HA-PR-Mutanten wurden aufgrund ihres hohen GC-Gehalts mit der *Herculase II Fusion* amplifiziert. Die Reaktion wurde in 50 µl Endvolumen wie folgt durchgeführt.

10 µl	5x Herculase II Reaktionspuffer
12, 5 pmol	Primer1
12, 5 pmol	Primer2
250 µM	dNTP-Mix
30 ng	DNA-Template
8%	DMSO
1 µl	<i>Herculase II</i>
ad 50µl	ddH ₂ O

Tabelle 4: PCR-Reaktion zur DNA-Amplifikation von GC-reichen Templaten

	GC-reiche DNA	Touch-down-PCR: z.B. HA-PRΔH
1. Denaturierung	95°C / 3 min.	95°C / 3 min.
2. reguläre Denaturierung	95°C / 45 sek.	95°C / 45 sek.
Annealing	max. 63°C / 45 sek.	56 °C-50°C schrittweise mit einer Differenz von 2°C; bis 52°C: 5 Zyklen mit 50°C: 25 Zyklen
Elongation	abhängig von Fragmentgröße, 72°C	72°C / 70 sek.
Letzte Elongation	4-7 min.	72°C / 4 min.
Zyklen	30	45

HA-PRΔH wurde in zwei Schritten kloniert. Im ersten Schritt wurden parallel die beiden Fragmente N-terminal und C-terminal vor bzw. hinter der Deletion amplifiziert. Das N-terminale Fragment wurde in einer *Touch-down-PCR*-Reaktion generiert. Die Ligation der beiden Produkte erfolgte via PCR (Abb. 9).

c) Ligation via PCR

Diese Methode der PCR wurde angewandt für die Klonierung aller HA-PR-Deletionsmutanten, der Flag-BAG-Ubidel-Mutante, sowie der mMR-GRLBD-Chimäre und der Flag-mMR-Punktmutanten. Die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes wurde in zwei aufeinander folgenden Reaktionen erreicht. Im ersten Schritt wurde in zwei getrennten Ansätzen der DNA-Abschnitt vor und nach der Deletion (Mutation) mit Primern amplifiziert, die komplementäre Überhänge besitzen. Anschließend wurden beide Fragmente aus einem Agarosegel isoliert, gereinigt und in gleichen molaren Verhältnissen in eine zweite PCR-Reaktion als DNA-Template eingesetzt. Abbildung 9 veranschaulicht diese Ligationsstrategie.

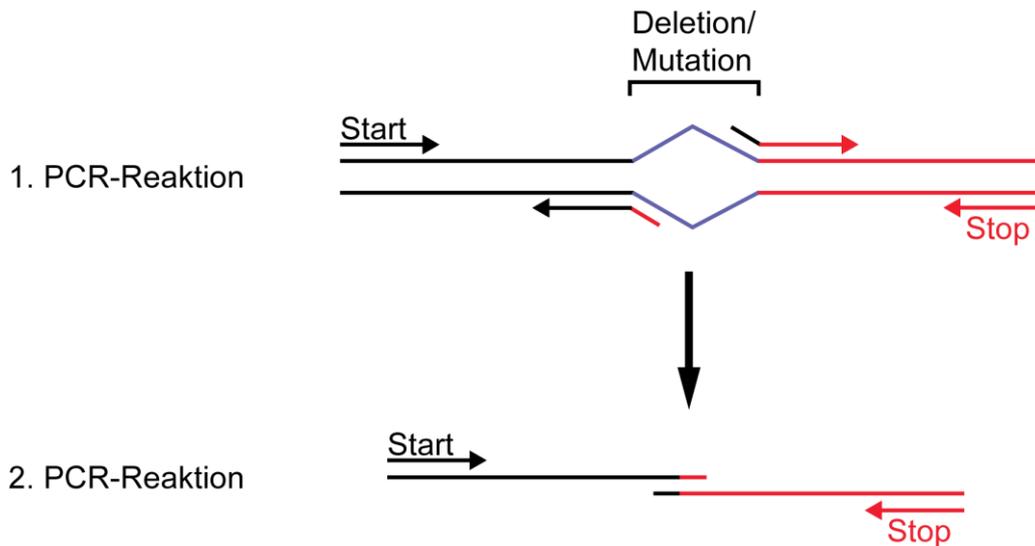


Abb. 9: Ligation zweier DNA-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Rektion.

Im Falle der mMR-GRLBD-Mutante so wie der meisten Flag-mMR-Mutanten wurde die erste PCR-Reaktion mit 20 Zyklen und die zweite Reaktion mit 30 Zyklen programmiert. Die Ligation dieser Fragmente im zweiten Schritt wurde in der Regel bei 68°C mit der *Pfu turbo* durchgeführt.

d) Amplifikation des murinen MR

Die Amplifikation des murinen MR zur Klonierung erfolgte in zwei Schritten. In der ersten PCR-Reaktion wurde die vollständige mMR-Sequenz aus HT22-cDNA amplifiziert. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

DNA-Template:	1 µl cDNA
10x Polymerasepuffer:	5 µl
Primer (5-mMR for):	30 pmol
Primer (3-mMR rev):	30 pmol
dNTPs (10 mM):	2,5 µl (500 µM)
BSA (2 mg/ml):	10 µl (0,4 µg/ml)
DMSO:	5 µl (10%)
PicoMaxx:	5 U
ddH ₂ O:	ad 50 µl

Die Reaktion wurde in 30 Zyklen durchgeführt. Die erste Denaturierung erfolgte für 3 min. bei 95°C. Alle weiteren Denaturierungsschritte wurden für 45 sek. bei 95°C

durchgeführt. Das Primer-Annealing fand für weitere 45 sek. bei 57°C statt. Die Elongation dauerte 8 min. und wurde bei 72°C durchgeführt. Ein letzter Elongationsschritt von 10 min. bei 72°C wurde nach dem letzten Zyklus hinzugefügt. Das Produkt dieser PCR-Reaktion wurde aus dem Agarosegel extrahiert und 5 µl des Eluats wurden als Template in die zweite PCR-Reaktion eingesetzt. In dieser Reaktion wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme zur Klonierung angefügt. Mit den Primern 5-EagI-mMR und 3-mMR-XhoI wurden am 5'-Ende des PCR-Produkts eine EagI und am 3'-Ende eine XhoI-Schnittstelle generiert. Die PCR wurde wie eben beschrieben in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde wie in 3.3.11 beschrieben gereinigt, verdaut, aus dem Agarosegel extrahiert (3.3.10) und in die Ligation mit dem entsprechend geschnittenen pRK7-Vektorrückgrad eingesetzt. Die Klone enthielten vier Mutationen, die in einem dritten PCR-Schritt wieder rückmutiert wurden.

e) Mutagenese von DNA-Fragmenten via PCR

Die Einführung von einer oder mehreren Punktmutationen in DNA-Sequenzen wurde mit dem „*QuikChange Site-Directed mutagenesis Kit*“ bzw. dem „*QuikChange Multi Site-Directed mutagenesis Kit*“ durchgeführt. Beide Kits funktionieren in der Regel nicht mit dem in unserem Labor verwendeten Standard-Vektor pRK5-SV40-MCS. Vor der Benutzung sollte man die Firma kontaktieren, da mind. ein kommerzieller Vektor bekannt ist, der mit diesem System nicht funktioniert. Beim Einführen einer Mutation amplifizieren zwei komplementäre Primer (25-45mere), die in der Mitte die Mutation tragen, beide Stränge eines Plasmids mit dem gewünschten Insert. Beide Stränge werden vollständig über 12-18 Zyklen amplifiziert. Da die Template-DNA aus dam⁺- Bakterien isoliert wurde, kann die Template-DNA im Anschluss durch das Enzym DpnI verdaut werden. Die DpnI-Endonuclease schneidet spezifisch methylierte oder hemimethylierte DNA und kann somit zwischen der Template- und Produkt-DNA unterscheiden. Anschließend werden 10 µl des Restriktionsansatzes in 100 µl DH5α transformiert.

Diese Methode der Mutagenese wurde in dieser Arbeit für die Rückmutation des aus cDNA amplifizierten mMR eingesetzt.

Für die Einführung mehrerer Mutationen (max. fünf) werden Primer mit der gleichen Orientierung verwendet, was zur Amplifikation eines Einzelstranges führt. Durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym DpnI wird die Template-DNA abgebaut. Die Amplifikation des zweiten Stranges findet nach der Transformation in den Bakterien statt. Hierfür wurden die vom Hersteller empfohlenen Bakterien zur Transformation verwendet. Diese Methode wurde verwendet um einige der pRK7-mMR_Mutanten zu generieren.

Die genauen Angaben zur PCR-Reaktion und Transformation sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3.3.7 Enzymatische Spaltung von DNA

Mit dieser Methode werden Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge mittels Restriktionsendonucleasen hydrolytisch gespalten. Die Puffer und Temperatur-Bedingungen richten sich nach dem jeweiligen Restriktionsenzym. Die Puffer wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Da es sich bei den Restriktionspuffern um 10-fach konzentrierte Stocklösungen handelt, wurde jeweils ein 1/10 des Volumens des Restriktionsansatzes verwendet. BSA (100x) wurde vorher 1:10 in autoklaviertem H₂O verdünnt und ebenfalls mit 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes eingesetzt.

Der Restriktionsverdau von PCR-Produkten erfolgte in 100 µl Endvolumen mit 20 U Restriktionsenzym. Der Reaktionsansatz wurde, bis auf wenige Ausnahmen, über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA-Fragmente wie in 2.3.10 beschrieben.

Die Vektor-DNA wurde in einem Endvolumen von 80 µl enzymatisch gespalten. Hierfür wurden 10 µg Vektor-DNA und 20 U Restriktionsenzym verwendet. Auch hier wurde der Reaktionsansatz bis auf wenige Ausnahmen über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausnahmen bildeten Restriktionsenzyme mit einem höheren Temperaturoptimum und diejenigen, die nach Angaben des Herstellers „Star-Aktivität“ entwickeln können. Die Vektor-DNA wurde ausschließlich mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese gereinigt.

Die Kontrollspaltung klonierter Plasmide erfolgte in einem Endvolumen von 20-50 µl mit 1-2µg Plasmid-DNA und 4 U Restriktionsenzym.

3.3.8 Enzymatische Ligation

Während der Ligationsreaktion der Vektor- und Insert-DNA werden 3'-OH mit 5'-Phosphatgruppen durch die *T4-DNA*-Ligase unter ATP-Verbrauch kovalent durch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen verknüpft.

Für die Klonierung der Konstrukte dieser Arbeit hat es sich häufig empfohlen, die Ligation in einem molaren Massen-Verhältnis (Vektor:Insert) von 1:3 bzw. 1:5 anzusetzen. Da alle Klonierungen mit zwei Restriktionsenzymen die überhängende Enden produzieren erfolgte, wurde auf eine Dephosphorylierung des Vektorrückgrates verzichtet. Die molaren Massenverhältnisse von Vektor und Insert wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Hierzu wurden gleiche Volumen beider DNA-Lösungen auf ein Agarosegel aufgetragen und die Intensitäten verglichen. Anhand eines mitgeführten DNA-Standards, dessen DNA-Mengen pro Bande bekannt war, konnte zusätzlich die Menge beider DNA-Fragmente bestimmt werden. Für die Ligationsansätze wurden zwischen 30 ng und 60 ng Vektor-DNA eingesetzt und die, den oben genannten Verhältnissen entsprechende Menge Insert-DNA. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und beinhaltete 100 U *T4*-Ligase. Die

Ligation erfolgte für 16 h bei 16°C, 10 h bei 10°C und wurde anschließend auf 4°C gekühlt. In die Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes eingesetzt (vgl. 2.2.3).

3.3.9 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

<u>Lösungen:</u>	10x TBE-Puffer pH 8,3:	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
	5x DNA-Auftragspuffer pH 7,6:	60% Glycerin, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 0,025% Bromphenolblau, 0,0025% Xylencyanol

Bei der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und analysiert werden. Für DNA-Fragmente unter 500 bp wurden 1,5-2% (w/v) Agarosegele gegossen, für größere Fragmente 1% (w/v) Agarosegele. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach der Zugabe von Ethidiumbromid (1:50000) in die etwas abgekühlte Lösung wurde das Gel in horizontalen Gelträgern inklusive Kamm gegossen und solange gelagert, bis es erstarrt war. Sobald das Gel fest war, wurde es zusammen mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt, mit 1x TBE-Puffer und Ethidiumbromid überschichtet. Nachdem der Kamm entfernt wurde, wurden der DNA-Standard und die DNA-Proben geladen. Letztere wurden mit 1/5 Auftragsvolumen mit 5x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte, abhängig von der Größe der Kammer, bei 60-150 V.

3.3.10 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach enzymatischen Reaktionen erfolgte durch Isolierung aus dem Agarosegel mit dem „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ nach Angabe des Herstellers.

Die DNA wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, abgewogen und mit dem 3-fachen Volumen QG-Puffer versetzt. Das DNA-Agarosestück wurde auf dem Heizblock bei 50°C 10 min. geschmolzen und anschließend in die mitgelieferten Säulen überführt. Nach der Entfernung des Agarose-Puffergemisches erfolgten zwei Waschschritte mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Ethanol-Puffer. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die DNA mit 30 µl (PCR-Produkte) bzw. 50 µl (Vektor-DNA) autoklaviertem ddH₂O eluiert. Alle Angaben zu Zentrifugationsschritten sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3.3.11 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR-Reinigungs-Kit

Die Reinigung enzymatisch gespaltener PCR-Produkte erfolgte mit dem Qiagen „*QIAquick PCR Purification Kit*“ nach Angaben des Herstellers.

Der Restriktionsverdau wurde mit dem 5-fachen Volumen PB-Puffer versetzt und anschließend in die mitgelieferten Säulchen überführt. Die Pufferlösung wurde durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Die auf die Säulenmatrix präzipitierte DNA wurde mit 750 µl PE-Ethanol-Puffer gewaschen. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die DNA mit 30 µl autoklaviertem ddH₂O eluiert. Alle Angaben zu Zentrifugationsschritten sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

a) BCA-Kit

Standardmäßig wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Kit bestimmt. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt, der Biuret-Reaktion, werden einwertige Kupferionen gebildet (Protein + Cu²⁺ in alkalischer Lösung → Cu⁺). Im zweiten Schritt erfolgt der spezifische Nachweis der einwertigen Kupferionen durch das wasserlösliche Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA). Die Interaktion von einem Cu⁺-Ion mit zwei BCA-Molekülen führt zur Bildung eines wasserlöslichen, violetten Chelats mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Somit kann die Proteinmenge photometrisch quantifiziert werden. Die Messung erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. Als Standardreihe wurde BSA mitgeführt, in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen.

Es wurden von jeder Standardkonzentration sowie von jeder Probe 10 µl pro Well (in Triplikaten) vorgelegt. Anschließend wurden 80 µl der BCA-Reagenzien, im Verhältnis 1:50 gemischt (siehe Handbuch), zugegeben und die Platte für 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde in einem Plattenleser nach Angaben des Herstellers gemessen.

b) Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist ebenfalls eine photometrische Quantifizierung der Proteinmenge. Diese Methode wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Puffern mit Reduktionsmitteln angewandt. Die „aktive“ Komponente im Bradford-Reagenz ist Coomassie Brilliant Blau, welches mit basischen Aminosäuren reagiert, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Als Standard wurde IgG mit einer Konzentration von 1,4 µg/µl mitgeführt. In Tabelle 5 ist das Pipettierschema der Standardreihe dargestellt.

Tabelle 5: Pipettierschema der Eichkurve mit IgG (1,4 µg/µl) als Standard und der eingesetzten Proteinmenge für die Eichgerade.

Standardreihe	µg IgG	µl Puffer	µl IgG
A	24,15	34,5	34,5 des Stocks
B	12,075	34,5	34,5 von Probe A
C	6,0375	34,5	34,5 von Probe B
D	3,01875	34,5	34,5 von Probe C
E	0,000	34,5	0-Wert = Blank

Das Bradford-Reagenz wurde vor der Zugabe zu den Proben 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Anschließend wurde zu 34,5 µl Proteinextrakt (Standard und Probe) 1 ml Bradford-Reagenz hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei Raumtemperatur erfolgte die Proteinbestimmung bei 595 nm. Es ist darauf zu achten, dass sich die OD₅₉₅-Werte der gemessenen Proben innerhalb der OD-Werte der Eichgerade befinden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>Lösungen:</u>	4x Trenngel-Puffer pH 8,8:	1,5 M Tris-HCl
	Sammelgel-Puffer pH 6,8:	1 M Tris-HCl
	10x Lämmli-Laufpuffer:	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,5% SDS
	5x Lämmli-Auftragspuffer:	40% Glycerin, 160 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% β -Mercaptoethanol, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblau
	APS 10% (w/v):	1 g in 10 ml
	Acrylamid, TEMED, Isopropanol	

Durch eine sogenannte SDS-PAGE können Proteine gemäß ihrer Molekulargewichte aufgetrennt werden. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an, wobei die Anzahl der angelagerten Moleküle proportional zur Proteingröße ist. Somit wird die Eigenladung der Proteine „maskiert“ und die Auftrennung im elektrischen Feld nur noch von den angelagerten SDS-Molekülen bestimmt. Das Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Beide Gele weisen unterschiedliche pH-Werte auf, was zu unterschiedlichen Ionenverhältnissen der beiden Gele führt. Aufgrund dieser Änderung der Ionenverhältnisse vom Sammel- zum Trenngel, laufen die Proteine im Sammelgel schneller. Beim Übergang in das Trenngel werden die Proteine zu einer scharfen Lauffront konzentriert. Nach ihrem Eintritt in das höher prozentige Polyacrylamid-Gel erfolgt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe.

Für die Herstellung der PAA-Gele wurden Glasplatten mit 1 mm breiten „*Spacern*“ verwendet. Die Trenngele (10-15%, vgl. Tabelle 6) wurden nach dem Gießen sofort mit Isopropanol überschichtet, wodurch eine scharfe Trennkannte entstand. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol gründlich entfernt und die Trenngele mit dem Sammelgel überschichtet. Zur Bildung der Ladetaschen wurden die systemeigenen Kämme verwendet.

Die Proteinproben wurden mit 1/5 Volumen Lämmli-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 94 °C denaturiert. Zur Reduktion von Disulfidbrücken ist im Auftragspuffer β -Mercaptoethanol enthalten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in den dazugehörigen BioRad SDS-Gelelektrophoresekammern. Bis zum Einlaufen in das Trenngel wurden 80-100V Spannung angelegt. Sobald die Auftrennung begann, wurde die Spannung auf 140-160V erhöht. Anschließend wurden die Proteine direkt im Gel mit Coomassie Blue G angefärbt oder auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und immunologisch charakterisiert.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und eingesetzte Volumina für zwei Trenngele und zwei Sammelgele. Die Volumina sind in ml angegeben.

Trenngele (10ml):					Sammelgele (5ml):
	10%	11%	12%	15%	5%
Acrylamid-Bis 30%	3,3	3,7	4,0	5	0,83
H₂O	4	3,6	3,3	2,3	3,4
4x Trenngel-Puffer					
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	2,5	-
Sammelgel-Puffer					
1,0M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	-	-	0,63
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005

3.4.3 Kolloidal Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Lösungen: 3x Fixierlösung: 90% EtOH, 6% Phosphorsäure
 Färbelösung: 17% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 34% Methanol
 Coomassie: Brilliant Blue G, 1 mg/ml

Coomassie färbt basische Aminosäuren und wurde hier für die Färbung der Gele für die quantitative Analyse verwendet.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und anschließend in 50 ml 1x Fixierlösung über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel dreimal für 20 min. mit ddH₂O gewaschen. Anschließend folgte eine einstündige Equilibrierung in 50 ml Färbelösung. Für die Färbung wurden nach einer Stunde 50 mg Brilliant Blue G Coomassie auf der Oberfläche der Färbelösung verteilt. Die Endkonzentration der Coomassie-Lösung betrug somit 1 mg/ml. Das Gel wurde für drei Tage bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gefärbt. War der Hintergrund zu stark war, wurde das Gel nach der Färbung so lange wie gewünscht in ddH₂O gewaschen,

um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Die so gefärbten Gele können mit etwas ddH₂O in Plastikfolie eingeschweißt, bei 4°C gelagert werden.

3.4.4 Westernblot-Analyse:

<u>Lösungen:</u>	Wetblot-Puffer:	125 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% MetOH +/- 0,04% SDS
	10x TBS pH 7,6:	100 mM Tris, 1,5 M NaCl
	1x TBST:	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween
	Ponceau-Lösung	
	2-5% Milch in 1x TBST	
	„Stripping“-Puffer pH 2,2:	0,2 M Glycin, 1% Tween, 1% SDS (frisch zugeben)
	Luminol:	250 mM 3-Aminophtahhydraizid in DMSO
	Coumarinsäure:	90 mM Coumarinsäure in DMSO
	ECL-Reagenz:	100 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 µl Luminol, 22 µl Coumarinsäure, 3 µl H ₂ O ₂
	Immobilon Western (chemiluminescence HRP-Substrat, Millipore)	

Der Protein-Transfer wurde im Wetblot-Verfahren durchgeführt. Hierbei werden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen, wo sie kovalent an das Membran-Material binden. Der Transfer wurde mit 250 mA (für zwei Gele) durchgeführt.

Der Westernblot ermöglicht die immunologische Charakterisierung der im denaturierenden Polyacrylamid aufgetrennten Proteine. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper können einzelne Proteine auf der Membran detektiert werden. Ein erster Antikörper bindet an ein bestimmtes Epitop auf der Membran. Mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der über den Fc-Teil der schweren Kette an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann diese Bindung durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von H₂O₂. Elektronen im Luminol werden angeregt. Sinken diese Elektronen wieder auf ihren Grundzustand ab, wird Licht emittiert. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms, der durch diese Lichtemission geschwärzt wird, können die Antikörpersignale visualisiert werden. Diese Antikörpersignale können auch direkt mit Hilfe einer Kamera aufgenommen werden (Imaging-System, Kodak).

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach der Elektrophorese in Wetblot-Puffer equilibriert, ebenso die Nitrozellulose-Membran. Der Blot wurde in den dafür vorgesehenen

Blot-Vorrichtungen („Sandwiches“, schwarz-weiß) von BioRad zusammengebaut. Der Aufbau in der Blot-Vorrichtung erfolgte von schwarz nach weiß (minus nach plus).

- Blot-Schwamm
- zwei Whatman-Papiere
- Gel
- Nitrocellulose-Membran
- zwei Whatman-Papiere
- Blot-Schwamm

Alle benötigten Materialien wurden vorher in Blot-Puffer äquilibriert bzw. eingeweicht. Das Zusammenbauen des Blots erfolgte unter Blot-Puffer, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Im Anschluss wurden die Blot-Vorrichtungen in die Blot-Kammern überführt, mit Kühl-Akkus versehen und mit Blot-Puffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte mit 250 mA pro Kammer (zwei Blots) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. 15% Gele wurden mit 0,04% SDS im Wetblot-Puffer geblotet, darum erfolgte der Transfer ohne Kühl-Akkus bei 4°C unter Rühren.

Nach zwei Stunden wurden die Membranen zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau angefärbt. Mit 1x TBST wurden die Membranen wieder entfärbt, bevor sie mit 5%-Milchpulver in 1x TBST für mindestens 30 min. (Raumtemperatur), meistens aber über Nacht bei 4°C geblockt wurden, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Blots mit dem primären Antikörper versehen (siehe 2.5) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur der sekundäre Antikörper zugegeben (siehe 2.5). Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x TBST erfolgte die Detektion mittels Immobilon Western HRP Substrat. Das ECL-Reagenz wurde zur Detektion der Cofaktoren der Westernblots der Reporter-Experimentes verwendet. Alle in dieser Arbeit gezeigten Blots wurden mit dem Imaging-System von Kodak aufgenommen. Es wurde jedoch zusätzlich auch ein Röntgenfilm entwickelt, um sicher zu stellen, dass die Höhe der detektierten Banden der zu erwartenden Proteingröße entspricht.

Da mehrere Proteine auf einer Membran detektiert wurden, war es nötig, die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen. Hierfür wurden die Membranen über Nacht bei Raumtemperatur in „Stripping“-Puffer inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal kurz mit 1x TBST gespült, anschließend erneut geblockt, und es wurde weiter verfahren wie oben beschrieben.

3.4.5 Färbung von Nitrozellulose-Membranen mit Amidoschwarz

<u>Lösungen:</u>	Amidoschwarz-Färbelösung:	0,5% Amidoschwarz, 40% MetOH, 10% Essigsäure
	Entfärbelösung:	40% MetOH, 10% Essigsäure

Diese Methode wurde ebenfalls zur Kontrolle des Transfers oder als Ladungskontrolle verwendet. Die Färbung ist reversibel aber nicht so sensitiv wie die Färbung von Proteinen im SDS-Gel mit kolloidal Coomassie. Die Membran wurde für 10 min. bei Raumtemperatur in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde solange mit Entfärbelösung gewaschen, bis die Hintergrundfärbung so minimal wie möglich war. Die so gefärbten Membranen wurden kurz mit ddH₂O gespült und eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.4.6 Protein-Protein Co-Immunpräzipitation

<u>Lösungen:</u>	Lysispuffer A':	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM NaCl, 20 mM Na ₂ MoO ₄ , 1mM EDTA, 10% Glycerin, 0,5% TritonX-100, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:100), 2 mM PMSF (frisch hinzufügen)
	1x TBS pH 7,6:	10 mM Tris, 150 mM NaCl
	1x PBS	
	0,1M Glycin pH 3,5 und pH 2,5	
	1x Flag-Peptid:	Stocklsg.: 5 mg/ml Endkonz.: 100 ng/μl in 1x TBS
	1x HA-Peptid:	Stocklsg.: 5 mg/ml Endkonz.: 100 ng/μl in 1x PBS

Die Co-Immunpräzipitation (CoIP) ist eine Möglichkeit, physikalische Wechselwirkung zwischen Proteinen nachzuweisen. Das Prinzip einer Co-Immunpräzipitation ist in Abbildung 10 dargestellt.

Alle CoIP-Experimente wurden mit Zellextrakt durchgeführt. Das Protein von Interesse wurde über spezifische Antikörper an einer Agarose- oder Sepharose-Matrix immobilisiert. Interagiert das Protein mit anderen zellulären Proteinen, werden diese über das immobilisierte Protein ebenfalls an die Matrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner, wurde das präzipitierte Protein eluiert und somit auch dessen Interaktionspartner. Die Proteine im Eluat können anschließend über ein Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt und im Westernblot immunologisch analysiert werden.

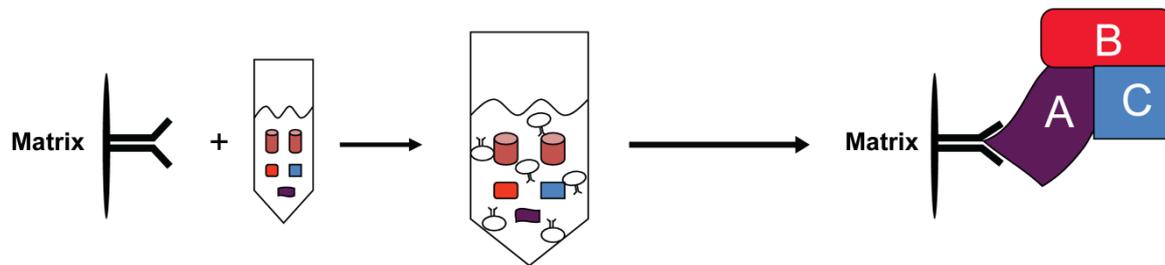


Abb. 10: Prinzip der Co-Immunpräzipitation (CoIP). Der Antikörper immobilisiert Protein A und gleichzeitig dessen Interaktionspartner B und C.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Antikörper für die CoIP verwendet, anti-Flag- und anti-HA. Beide Antikörper sind kovalent an eine Agarose-Matrix gekoppelt. Das im folgenden Abschnitt beschriebene experimentelle Vorgehen ist für beide Antikörper gleich, mit zwei Ausnahmen, im Falle der HA-Agarose wurde 1x PBS statt 1x TBS für die Waschschriffe verwendet und 0,1 M Glycin pH 2,5 an Stelle von pH 3,5.

HEK 293 Zellen wurden für die Elektroporation 1:4 in steroidfreies DMEM-Medium in der entsprechenden Anzahl 60 cm²-Kulturschalen ausgesät. Pro Ansatz wurde eine Schale verwendet. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit der Plasmid-DNA der zu untersuchenden Proteine cotransfiziert. Für die Flag-CoIP wurden 8 µg Flag-Cofaktor Plasmid-DNA und jeweils 2 µg HA-Rezeptor Plasmid-DNA verwendet. Für die HA-CoIP wurden 8 µg des Expressionsplasmids für den HA-Rezeptor und 2 µg des Flag-Cofaktor kodierenden Plasmids eingesetzt. Drei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml kaltem 1x PBS abgekratzt und bei 371 x g und 4°C für 4 min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Lysispuffer A' pro Ansatz resuspendiert und eine Stunde auf Eis lysiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt mit 25000 x g bei 4°C für 10 min. wurde der Zellextrakt (Überstand) für die CoIP generiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Kit bestimmt.

Pro Ansatz wurden 50 µl Antikörper-Agarose-Suspension verwendet. Die Vorbereitung der Agarose erfolgte mit der gesamten, für das Experiment benötigten Menge. Erst kurz vor Zugabe des Zellextraktes wurde die Antikörper-Agarose zu gleichen Mengen auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt.

Die Agarose wurden dreimal mit 500 µl kaltem 1x TBS/1x PBS bei 10000 g und 4°C für 30 sek. gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit kaltem 0,1 M Glycin pH 3,5/2,5 um ungebundene bzw. nicht vollständig gebundene Antikörper zu entfernen. In zwei weiteren Waschschriffen wurde der pH-Wert wieder neutralisiert. Für den dritten Waschschriff wurde die Agarose in einem höheren Volumen resuspendiert und gemäß der Anzahl an Proben gleichmäßig auf frische 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und ein letztes Mal mit 10000 x g bei 4°C für 30 sek. zentrifugiert. Vor der Beladung der Agarose mit Zellextrakt wurde der Überstand vollständig entfernt. Jeder Ansatz wurde mit 1,5 mg Zellextrakt versehen und mit Lysispuffer A' auf ein Endvolumen von 1 ml auf gefüllt. Hier

empfiehlt es sich, zuerst den Puffer auf die Agarose zu geben, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nach Zugabe des Zellextrakts wurden die Proben über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit kaltem 1x TBS/1x PBS gewaschen in dem sie wiederum mit 10000 x g bei 4°C für 30 sek. zentrifugiert wurden. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 50µl Flag-Peptid/HA-Peptid (100 ng/µl) in 1x TBS/1x PBS bei 4°C für eine Stunde auf dem Überkopfschüttler. Im Anschluss daran wurden die Proben ein letztes Mal mit 10000 x g für 1 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (50µl) wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 15µl Lämmli-Auftragspuffer versehen. Die Proteine wurden bei 95°C für 5 min. denaturiert.

3.4.7 Quantifizierung der Westernblots und Coomassie-Gele

Die Quantifizierung der Co-Immunpräzipitationsexperimente wurde mit der 1D Image Analysis Software 3.6 durchgeführt. Für die Quantifizierung des Rezeptors sowie der endogenen Proteine wurde der Westernblot verwendet.

Die präzipitierte Menge an Rezeptor wurde zuerst auf die Expressionskontrolle (Lysat) normalisiert ($\frac{HA(CoIP)}{HA(Lysat)} = X$) und anschließend auf die Menge präzipitierten Cofaktors ($\frac{X}{Flag-IP}$). Die co-präzipitierten endogenen Proteine wurden direkt auf den Antikörper-präzipitierten Cofaktor normalisiert. Die Menge an präzipitiertem Cofaktor wurde in kolloidal Coomassie gefärbten Gelen quantifiziert. Da es sich bei den Cofaktoren um Hsc70/Hsp70 Cochaperone handelt, konnte die Menge an copräzipitiertem Hsc70/Hsp70 ebenfalls über Coomassie gefärbte Gele ermittelt werden. Die Quantifizierung kann auf zwei verschiedene Arten mit dieser Software erfolgen. Es können die ROI (*region of interest*) ermittelt werden oder die Bandendicke mit Hilfe des Histogramms. Wählt man die Methode der ROI, dann muss der Blot-Hintergrund mitbestimmt werden, der vor der Normalisierung von allen Proben-Werten abgezogen wird. Für die Quantitative Analyse wurden jeweils die Werte der Netto-Intensität (*Net-Intensity*) verwendet.

Für die Quantifizierung der CoIP-Westernblots wurde die Bandendicke mit Hilfe des Histogramms bestimmt. Das gleiche gilt für die Quantifizierung der Coomassie-Gele.

Die Quantifizierung der Westernblots der Hormonbindungsanalyse erfolgte mit der ROI-Methode, da die Banden teilweise schon stark gesättigt zu sein schienen.

3.4.8 Polarisationsexperiment: Hormonbindungsanalyse

<u>Lösungen:</u>	2x Tris-Puffer pH 7,4:	10 mM Tris, 2 mM EDTA
	TGW-Puffer (200 ml):	100 ml 2x Tris-Puffer, 10 ml Glycerin ad 200 ml auffüllen mit ddH ₂ O
	200 mM PMSF:	in EtOH
	TGW ⁺⁺⁺ -Puffer (25ml):	24, 5 ml TGW-Puffer, 3, 5 µl β-Mercaptoethanol 250 µl Proteaseinhibitor-Cocktail, 250 µl PMSF (200 mM)

Alle Puffer wurden bei 4°C gelagert. PMSF wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Proteaseinhibitor-Cocktail, PMSF und β-Mercaptoethanol sind vor der Verwendung frisch hinzuzugeben.

Mit dem „PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit, Far Red“ von Invitrogen wurde die Hormonbindungsfähigkeit des GR in Anwesenheit und ohne Cofaktor gemessen. Diese Methode macht sich eine Eigenschaft von fluoreszierenden Molekülen in Lösung zu nutze. Werden die Moleküle mit polarisiertem Licht angeregt, emittieren sie wiederum polarisiertes Licht, das mit den entsprechenden Filtern gemessen werden kann. Bei dieser Messung wird zweimal mit polarisiertem Licht angeregt, einmal parallel und einmal senkrecht. Die gemessene Polarisation wird mit der Einheit [mP] angegeben. Mit nachfolgender Formel wurden die mP-Werte berechnen.

$$mP = \frac{\text{parallel} - \text{senkrecht}}{\text{parallel} + \text{senkrecht}} * 1000$$

In diesem Kit wird ein selektiver GR Agonist verwendet, an den ein Fluorochrom gekoppelt ist. Die Anregungswellenlänge beträgt 610 nm. Die Emission wird bei 670 nm gemessen. Diese Verbindung, Fluoromon genannt, wird in subsaturierenden Konzentrationen verwendet. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Hormonbindungsstudien, wird hier nicht die Hormonkonzentration, sondern die Rezeptormenge titriert. Es wird bei einer konstanten Fluoromon-Konzentration von 4 nM gemessen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, emittiert das freie Fluoromon in Lösung weniger polarisiertes Licht, es besitzt somit eine niedrigere Polarisation. Nach Zugabe von GR-Molekülen, die in der Lage sind, das Fluoromon zu binden, wird eine höhere Polarisation bei 670 nm gemessen, da das Fluoromon immobilisiert wurde.

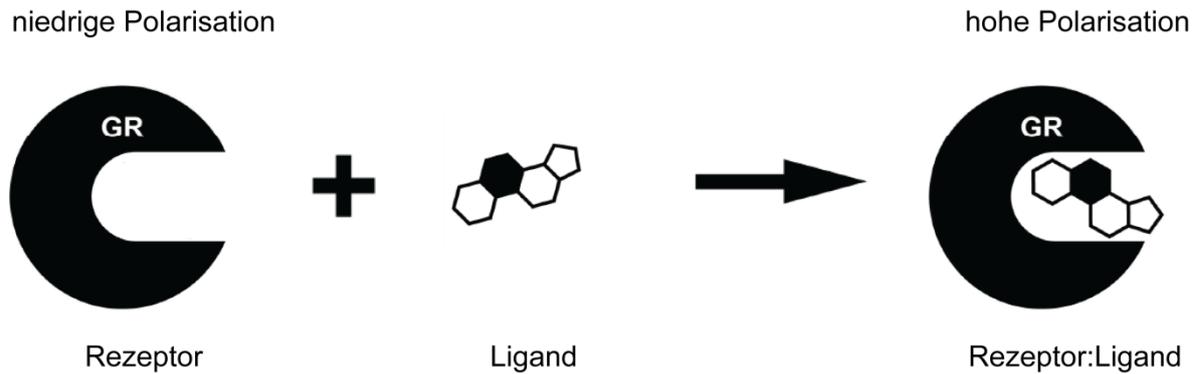


Abbildung 11: Prinzip des Polarisationsexperimentes (nach dem Handbuch des Herstellers, Invitrogen, Karlsruhe).

HEK 293 Zellen wurden für diese Experimente zwei Tage vor der Elektroporation in steroidfreiem DMEM-Medium 1:4 ausgesät. Pro Ansatz wurden 10x 60 cm²-Schalen verwendet. Die Zellen wurden mit 3,5 µg HA-GR Expressionsplasmid und 6,5 µg der Plasmid-DNA der jeweiligen Flag-Cofaktor bzw. 6,5 µg pRK5-SV40 MCS als Kontrolle cotransfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und in kaltem TGW⁺⁺⁺-Puffer nach der Dounce-Methode homogenisiert. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugations-schritt mit 25000 x g bei 2°C für 20 min. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge mit 32000 rpm (Beckman Ultrazentrifuge, SW60-Rotor) für eine Stunde bei 2°C ein weiteres Mal zentrifugiert. In dem Überstand der Ultrazentrifugation wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (siehe 2.4.1b). Für die Experimente wurden alle Proben auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Die Herstellung des Assay-Puffers erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das mitgelieferte Fluoromon (400 nM) wurde auf 8 nM mit Assay-Puffer eingestellt. Dabei wurden „low binding“ Reaktionsgefäße verwendet. Gemessen wurden acht verschiedene Messpunkte, die wie in Tabelle 7 angegeben, hergestellt wurden. Ein Messpunkt entspricht also einer definierten Lysatmenge.

Die Messung der Polarisation erfolgte in 384-Well Mikrotiterplatten („low binding“). Hierfür wurden in jedes Well 20 µl Fluoromon (8nM) vorgelegt und 20 µl Probe zugegeben. Nach einer kurzen Durchmischung der Platte erfolgte die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 610 nm. Die Emission wurde bei 670 nm gemessen. Die Durchschnittstemperatur betrug 25°C. Die Kinetik wurde in den kürzest möglichen Abständen über ca. 3 Stunden gemessen.

Alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Proteinbestimmung und der Polarisationsmessung fanden auf Eis bzw. 4°C statt.

Tabelle 7: Pipettierschema für die Polarisationsexperimente. Bei einer konstanten Fluoromon-Konzentration (4nM) wurde die Proteinmenge in dreifachen Verdünnungsschritten titriert.

Messpunkt	Assay-Puffer (AP) in μl	Probe
1	-	45 μl unverdünnte Probe
2 bis n	30	15 μl von n-1

3.4.9 Bestimmung der Menge an hormonbindungsfähigem Rezeptor mit [^3H]-Kortikosteron

Lösungen: TGW⁴⁰⁺: 5 mM Tris, 40 mM Natriummolybdat,
1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin
Aktivkohle/Dextran-Suspension: 375 mg Aktivkohle, 37,5 mg Dextran
In 10 ml TGW⁴⁰⁺ resuspendieren

Beide Lösungen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Menge an hormonbindungsfähigem GR wurde in Lysaten mit der maximalen Proteinmenge bestimmt, die auch für die Polarisationsexperimente eingesetzt wurden. Es wurden 50 μl Zellextrakt mit der gewünschten Proteinmenge mit 50 μl TGW⁴⁰⁺ gemischt. Anschließend wurden die Proben mit 50 μl [^3H]-Kortikosteron mit einer Konzentration von 300 nM versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4°C erfolgte ein Hitzeschritt im Wasserbad bei 25°C für 30 min. Durch die Zugabe von 50 μl der Aktivkohle/Dextran-Suspension wurde freies Hormon von an Rezeptor gebundenem Hormon abgetrennt. Hierfür wurde die Mischung erst 10 min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 1 min.. Vom Überstand wurden 100 μl abgenommen und in Szintillationsröhrchen überführt und mit 2,3 ml Szintillationslösung versetzt. Nachdem die Proben gut gemischt wurden, damit eine homogene Lösung entsteht, wurde die gebundene Radioaktivität im *Scintillation-Counter* bestimmt. Als Kontrolle (KH) für die Abtrennung des ungebundenen Hormons wurde die gleiche Menge Puffer mit radioaktivem Hormon versetzt. Die zelleigenen Hintergrundbindung wurde in untransfiziertem Lysat (LE) ermittelt. Für die Berechnung der Menge an ligandenbindungsfähigem GR wurde sowohl der Kontrollwert (KH) als auch der Wert der Hintergrundbindung (LE) von den Proben-Werten (P) subtrahiert $((P - KH) - (LE - KH))$. Die gemessenen Werte der Rezeptor-Kontrolle (nur HA-GR) wurden auf 100% festgelegt und als Bezugspunkt für die Berechnung der gebundenen Hormonmenge in den verschiedenen Ansätzen verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von BAG-1M auf den Progesteronrezeptor (PR): Funktions- und Interaktionsanalyse

Die Eigenschaft von BAG-1 (*Bcl-2 associated athanogene 1*), in seiner Wirkung zwischen dem Glukokortikoidrezeptor (GR) und dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) zu diskriminieren, macht es zu einem attraktiven Kandidaten für zukünftige Studien. Aus diesem funktionellen Unterschied könnten sich vielversprechende Ansätze für die Entwicklung von spezifischen Medikamenten zur Verbesserung der GR-Signaltransduktion ergeben. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die Wirkung von BAG-1 auf verwandte SR zu kennen. Der GR, der Androgenrezeptor (AR) sowie der Östrogenrezeptor (ER) wurden diesbezüglich bereits untersucht (Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 1999; Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003; Cutress *et al.*, 2003). In der Literatur finden sich bislang keine Angaben über den Einfluss von BAG-1 auf den Progesteronrezeptor (PR), der zur Klasse I der SR gehört. Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob BAG-1M einen Einfluss auf die Funktion des PR ausübt, und ob sich dieser gegebenenfalls mechanistisch mit der Wirkungsweise von BAG-1M auf den GR oder AR vergleichen lässt.

4.1.1 Inhibition der Aktivität des Progesteronrezeptors durch BAG-1M

Der Einfluss von BAG-1M auf die funktionelle Aktivität des PR wurde in Reporter-Experimenten untersucht. Als Reporter-Gen wurde die Luciferase aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* (*Firefly*) unter der Kontrolle MMTV-Promotors (*mouse mammary tumor virus*) verwendet (Hollenberg & Evans, 1988). Dieser Promotor wird durch SR aktiviert, die an seine Glukokortikoid-responsiven-Elemente (GRE) binden. Als Substrat für die *Firefly*-Luciferase wurde D-Luciferin verwendet. Unter Substratsättigung führt die Umsetzung von Luciferin (siehe 3.1.7) zu einer messbaren Photonen-Emission, die proportional zur exprimierten Menge an Luciferase-Protein ist, und somit auch proportional zur Aktivität des zu untersuchenden SR. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde eine zweite Luciferase aus *Gaussia princeps* (*Gaussia*) benutzt. Transkribiert von dem konstitutiv aktiven CMV-Promotor (*Cytomegalovirus*) wird sie Rezeptor-unabhängig exprimiert. Das Substrat der *Gaussia* ist Coelenterazin, welches ebenfalls in einer Lumineszenz-Reaktion umgesetzt wird. Beide Enzyme haben unterschiedliche Reaktionsoptima und können daher im selben Extrakt nach Anpassung der Pufferbedingungen gemessen werden.

Da der inhibitorische Effekt von BAG-1 auf die GR-Aktivität von der Interaktion mit Hsc70/Hsp70 (*heat shock cognate 70 kDa protein/heat shock 70 kDa protein*) abhängig ist (Schneikert *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003), wurde eine Mutante von BAG-1M (BAG-1M_mut) als Kontrolle für die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit mitgeführt. Ein

Aminosäureaustausch (R237A) in der C-terminalen BAG-Domäne führt bei dieser Mutante zum Verlust der Interaktion mit Hsp70 (Sondermann *et al.*, 2002).

Wie in Abbildung 12 dargestellt ist, führte die Überexpression von BAG-1M in Cos-7 Zellen zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivität des PR (Abb. 12A).

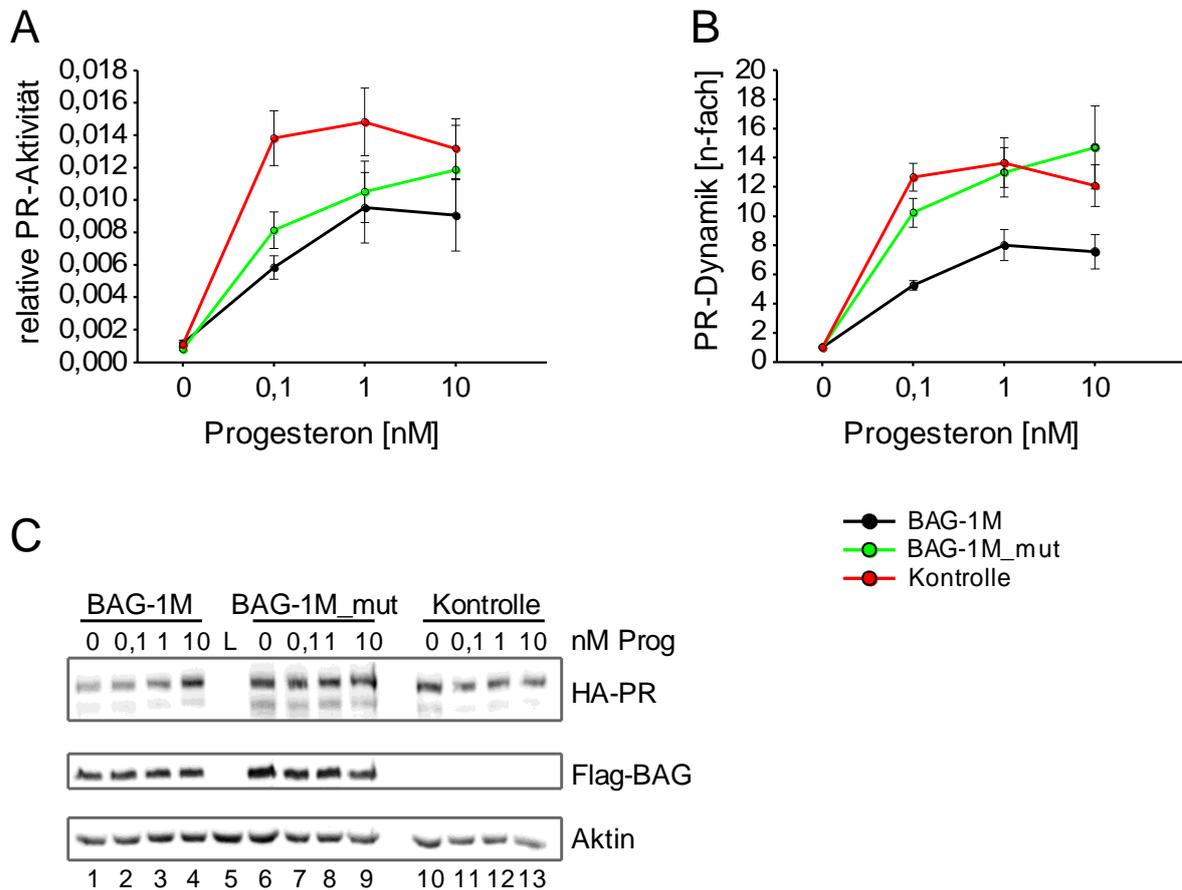


Abbildung 12: BAG-1M inhibiert die Transaktivierung des Progesteronrezeptors. 8000 Cos-7 Zellen wurden mit verschiedenen Plasmidkonstrukten transfiziert (12,5 ng HA-PR, 60 ng MMTV-Luc, 5 ng Gaussia-KDEL sowie 200ng Flag-BAG-1M, -mut oder Leervektor als Kontrolle). Die Zellen wurden für 24 h mit Ethanol bzw. steigenden Konzentrationen Progesteron versetzt. **(A)** Relative Rezeptor-Aktivität (\pm SEM), dargestellt als die durch Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte. **(B)** Die n-fache Stimulierbarkeit des PR, dargestellt durch den Quotienten der Messwerte der Extrakte von Hormon-behandelten Zellen zu denen von Ethanol behandelten Zellen. In A und B sind die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. **(C)** Westernblot eines Reporteragen-Experiments aus dieser Reihe. Die Detektion der verschiedenen Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen HA (PR), Flag (BAG-1M) und Aktin (Ladekontrolle). Der in Spur fünf (L), geladene Extrakt nicht transfizierter Zellen diente zur Kontrolle der Antikörperspezifität.

Die BAG-1M-Mutante, die nicht mehr an Hsp70 bindet, inhibierte den PR ebenfalls (Abb. 12A). Diesen Ergebnissen zufolge würde der negative Effekt von BAG-1M auf die PR-Funktion nicht über Hsp70 vermittelt werden, im Gegensatz zur Situation beim GR. In Abbildung 12B ist eine andere Art der Darstellung derselben Daten gezeigt. Hier ist die n-

fache Rezeptor-Stimulierung, d.h. die Rezeptor-Dynamik abgebildet. Die Stimulierbarkeit der Rezeptoren wird aus dem Quotienten der Werte aus Hormon behandelten Zellen zum Wert der unstimulierten Zellen gebildet (Hormon/Ethanol). Im Gegensatz zu den mit den Werten der Gaussia-Luciferase normalisierten Rohdaten zeigte sich hier eine Hsp70-Abhängigkeit des BAG-1M-Effektes. Diese scheinbare Widersprüchlichkeit kann entstehen, wenn die Cofaktoren einen Effekt auf den Wert der unstimulierten Zellen haben.

Um die Expression des Rezeptors kontrollieren zu können, wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt (Beispiel in Abb. 12C). Es zeigt sich, dass BAG-1M keinen Einfluss auf die Menge exprimierten Rezeptors verglichen mit der Kontrolle hatte. Folglich konnte für BAG-1M ein inhibitorischer Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des PR, der in einer Reduktion der Rezeptormenge begründet war, ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser funktionellen Analyse ließen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob BAG-1M den PR Hsp70- abhängig inhibiert. Im Gegensatz zum PR weist der GR nicht nur in seiner Funktion eine Sensitivität für den Hsp70-vermittelten Effekt von BAG-1M auf, sondern auch in seinem Interaktionsmodus mit dem Nukleotid-Austauschfaktor (NEF) von Hsc70/Hsp70 (Schneikert *et al.*, 2000). Ob die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der Interaktion mit BAG-1M auch für den PR gilt, wird im Folgenden untersucht. Diese Daten sollen zur Interpretation der Ergebnisse der funktionellen Analyse beitragen

4.1.2 Hsc70/Hsp70-vermittelte Interaktion des Progesteronrezeptors mit BAG-1M

Um die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit für die PR-Inhibition detaillierter zu untersuchen, wurden Studien zur Interaktion von BAG-1M und PR in Co-Immunpräzipitationsexperimenten durchgeführt. HEK 293 Zellen wurden hierzu mit den kodierenden Plasmiden für HA-PR und Flag-BAG-1M bzw. Flag-BAG-1M_mut oder nur Rezeptor-Plasmid, als Kontrolle der Expression und Antikörperspezifität, transfiziert. Die Präzipitation von BAG-1M erfolgte durch Anti-Flag-Agrose. Nach der spezifischen Elution mittels Flag-Peptid wurde das präzipitierte und copräzipitierte Material im Westernblot analysiert (Abb. 13). Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot der Interaktionsstudie von PR und BAG-1M.

Zunächst wurde die Rezeptor-Expression überprüft. Wie im Lysat sichtbar, führte die ektopische Expression des PR alleine zu einem schwachen Genprodukt (Spur 1), welches nicht unspezifisch copräzipitiert wurde (Spur 4). Der Vergleich der PR-Spiegel mit und ohne BAG-1M_mut zeigte eine stärkere PR-Bande in Anwesenheit von BAG-1M_mut (Spur 3). Diese Unterschiede in den PR-Spiegeln könnte auf einen Unterschied in der Transfektionseffizienz zurückgeführt werden. In der Co-Immunpräzipitation zeigte sich in der PR-Interaktion mit BAG-1M eine deutliche Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit (vgl. Spur 5 mit Spur 6). Die relativ schwache Bindung des Rezeptors an BAG-1M_mut (Spur 6) erklärte sich durch die ebenfalls sichtbare Restbindung von Hsc70/Hsp70 an die BAG-Mutante.

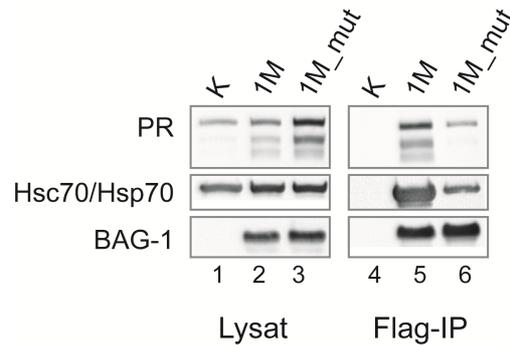


Abbildung 13: Co-Immünpräzipitation des PR mit BAG-1M bzw. BAG-1M_mut. HEK Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Flag-BAG-1M bzw. Flag-BAG-1M_mut (je 8 µg) und HA-PR (2 µg) cotransfiziert. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse. Das Zelllysate wurde mit anti-Flag-Agarose über Nacht inkubiert. Nach der Elution mit Flag-Peptid wurden je 15 µg Lysat (links) und 20 µl präzipitiertes Material (rechts, Flag-IP) auf ein 10%iges PAA-Gel geladen. Nach dem Westernblot wurden die einzelnen Proteine mit Antikörpern gegen HA (PR), BAG-1 und Hsc70/Hsp70 detektiert. Als Kontrolle für die Expression und die Spezifität der anti-Flag-Agarose wurden 2 µg HA-PR Plasmid in einem zusätzlichen Ansatz transfiziert.

Diese Daten unterstützten die Schlussfolgerung, dass BAG-1M die transkriptionelle PR-Dynamik Hsp70-abhängig inhibiert (Abb. 12B). Die Relevanz der Hsp70-Abhängigkeit für die Bindung an BAG-1M konnte durch diese Interaktionsstudie bestätigt werden.

Nicht nur für den GR, auch für den AR wurde die Hsp70-Abhängigkeit des BAG-1 Effektes sowohl funktionell als auch in der Interaktion festgestellt (Schneikert *et al.*, 2000); (Schmidt *et al.*, 2003; Shatkina *et al.*, 2003). Literaturdaten zu AR und GR lassen vermuten, dass eine Interaktion von BAG-1 mit N- und C-terminalen Bereichen der SR zu einer Stimulierung deren transkriptioneller Aktivität führen könnte, während sich eine Interaktion mit der Hinge-Region inhibierend auswirkt (Shatkina *et al.*, 2003); (Kullmann *et al.*, 1998).

Daraus ergaben sich für den PR folgende Fragen: An welche Domäne des PR bindet BAG-1M und ist diese essentiell für den inhibitorischen Einfluss von BAG-1? Experimente zur Beantwortung dieser Fragen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1.3 Herstellung verschiedener Progesteronrezeptor-Mutanten

Die ersten Deletionsmutanten des PR wurden auf Basis von Sequenzvergleichen und Strukturdaten kloniert (Abb. 14A). Die N- und C-terminalen PR-Deletionsmutanten sind analog zu den Mutanten AR 488-919 und AR 1-633 (Shatkina *et al.*, 2003). Die Deletion der Hinge-Region Δ H1 (AS 641-658, H1) basierte auf der Mutante AR Δ 633-650. Diese PR-Reste umfassen den Großteil der Region, die im GR der beschriebenen Hinge-Region entspricht (Kullmann *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu der Hinge-Region, die sich aus dem Sequenzvergleich mit dem AR ergab (Δ H1), wird die Hinge-Region des PR in einer Literaturstelle als Region von AS 642-687 angegeben (Takimoto *et al.*, 2003). Dieser Bereich steht auch nicht im Widerspruch zu Strukturdaten des PR-DNA-Komplexes (pdb 2C7A: Roemer *et al.*, 2006) und der PR-Ligandenbindungsdomäne (PR-LBD) (pdb 1A28: Williams & Sigler, 1998). Daher wurde zur Analyse der Hinge-Region eine weitere Deletionsmutante kloniert, PR Δ H (Δ 641-684) (Abb. 14B). Die Reste der DNA-Bindungsdomäne (DBD, AS 563-640) wurden anhand der Kristallstruktur des Progesteronrezeptor-DNA-Komplexes ermittelt (pdb 2C7A: Roemer *et al.*, 2006). Da die Hsp70-Abhängigkeit der funktionellen Inhibition des PR, anders als beim GR, offenbar ausschließlich die Rezeptor-Dynamik betraf, stellte sich hier die Frage, ob die Interaktion mit dem PR gar nicht bzw. nicht nur über die Hinge-Region vermittelt wird.

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) wurde aus zwei Gründen kloniert. Einerseits ist bekannt, dass BAG-1M die DNA-Bindung des GR inhibiert (Kullmann *et al.*, 1998) und BAG-1M unspezifisch an DNA bindet (Zeiner *et al.*, 1999; Niyaz *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003). Andererseits führt die Deletion der DNA-Bindungsdomäne zur Inaktivierung des PR in den Reporter-Experimenten, daher konnte nur durch die Interaktionsanalyse mit der reinen DBD oder der Δ DBD festgestellt werden, ob diese Domäne zur Bindung und deshalb unter Umständen zum inhibitorischen Effekt von BAG-1M beiträgt.

Da das PR-Fragment 494-641 in fast allen Konstrukten vorhanden war, wurde es als Einzelfragment hergestellt um alle Domänen, die als mögliche Interaktionsstellen für BAG-1M in Frage kommen, unterscheiden zu können. In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls die Reste 494-562 in einem weiteren Konstrukt deletiert (PR Δ 494-562).

Nicht nur im GR, sondern auch im Vitamin D-Rezeptor (VDR) stellt die Hinge-Region eine Interaktionsstelle mit bestimmten Cofaktoren dar. Im VDR wurde sie als Bindungsstelle für das bakterielle Hsp70-Homolog, DnaK, beschrieben (Swamy *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde das Fragment PR_DBDH kloniert (AS 563-684) (Abb. 14B). Mit diesem Fragment konnte zum einen untersucht werden, ob die Hinge-Region per se einen direkten Beitrag zur BAG-1-Bindung leistet, zum anderen, ob die Hinge-Region des PR ebenfalls für die Hsp70-Interaktion wichtig ist. Dies galt auch für das PR-494-641-Konstrukt.

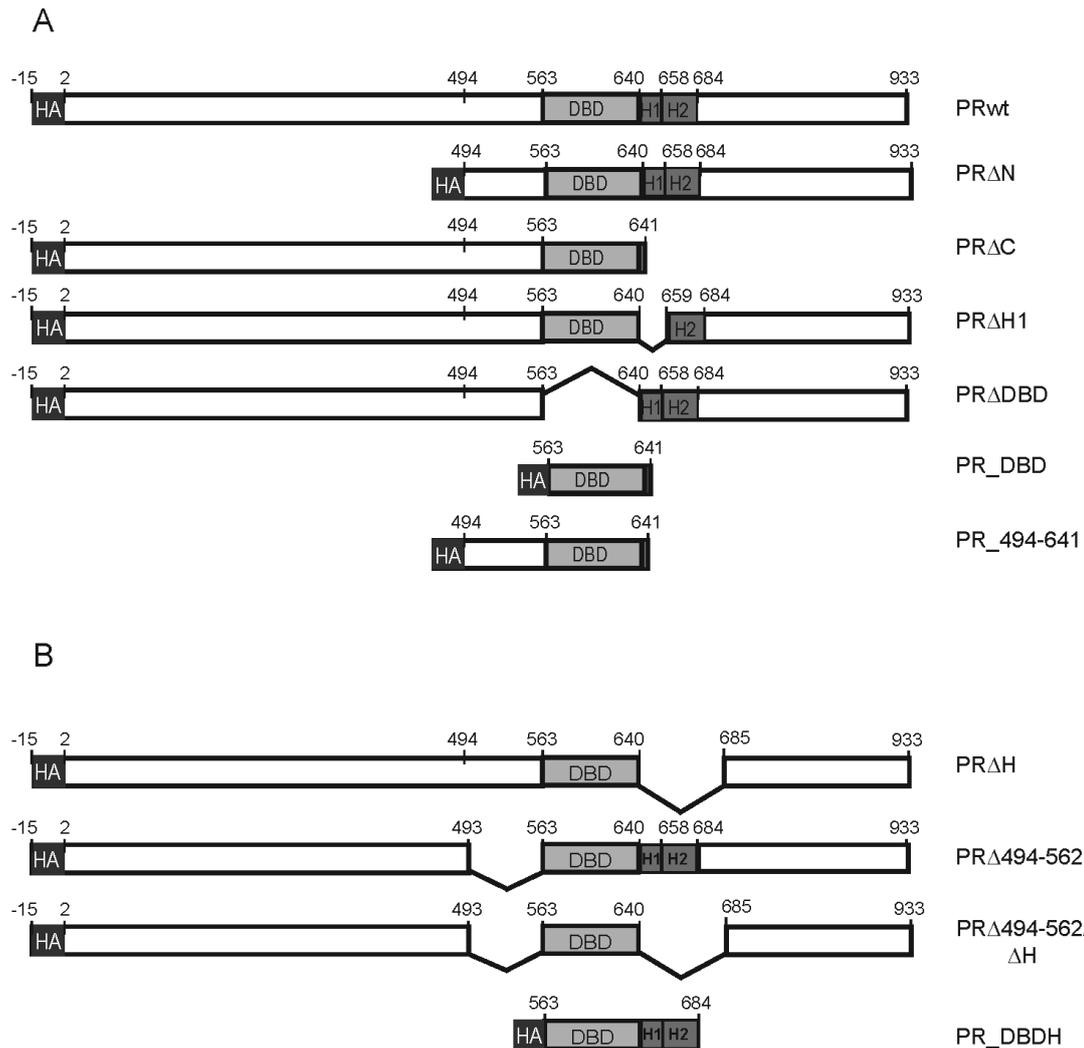


Abbildung 14: Schematische Darstellung der PR-Deletionsmutanten. Wie PRwt wurden alle Mutanten mit einem einfachen N-terminalen HA-Tag kloniert. **(A)** Die PR Δ N und PR Δ C Mutante basieren auf einem Sequenzalignment des PR mit dem AR. Beide Mutanten sind vergleichbar mit den AR-Mutanten AR 488-919 und AR 1-633 (Shatkina *et al.*, 2003). Die Deletion Δ DBD wurde anhand der Kristalldaten konstruiert (pdb 2C7A: Roemer *et al.*, 2006). Die Δ H1_Mutante entspricht der AR-Mutante AR 633-650. Die gesamte Hinge-Region des PR wurde hier in H1 (AS641-657) und H2 (AS 658-684) unterteilt. Das kurze Fragment 494-641 enthält die N-terminalen Reste der PR Δ N Mutante bis zur DBD. Die DNA-Bindungsdomäne umfasst die Reste 563-641. **(B)** Die Deletion in der PR Δ H-Mutante umfasst die vollständige Hinge-Region (H1 und H2, AS 641-684). In PR Δ 494-562 wurden die genannten Reste deletiert. Der Doppelmutante PR Δ 494-562/ Δ H fehlen die Reste 494-562 und die gesamte Hinge-Region (AS 641-684). Das Fragment PR_DBDH umfasst die DBD und Hinge-Region (AS 563-684).

Um ausschließen zu können, dass die Reste vor der DBD (AS 494-562) und die Hinge-Region (AS 641-684) aufgrund der Rezeptor-Faltung beide an der Bindung an BAG-1M-beteiligt sind, wurde die Doppelmutante PR Δ 494-562/ Δ H kreiert (Abb. 14B). Im nächsten Schritt wurde die Aktivität der verschiedenen PR-Mutanten untersucht.

4.1.4 Funktionelle Analyse der Progesteronrezeptor-Mutanten

Auf die funktionelle Analyse der kurzen Fragmente, PR₄₉₄₋₅₆₂, PR_{DBD} und PR_{DBDH} wurde verzichtet, da davon auszugehen ist, dass diese kurzen Fragmente nicht transkriptionell aktiv sind. Die Aktivität der verschiedenen PR-Mutanten wurde wie in 4.1.1 in Reporter-gen-Experimenten untersucht (Abb. 15). Die hier dargestellten Daten wurden in zwei verschiedenen Ansätzen generiert. Der Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Mutanten mit PR_{wt} (schwarz) zeigte, dass die Mutanten in zwei Gruppen unterteilt werden konnten. Zur Gruppe der aktiven PR-Mutanten gehörten PR Δ C (grün), PR Δ 494-562 (rosa) sowie PR Δ H1 (blau) (Abb. 7B). Im Gegensatz dazu zeigten PR Δ N (rot) sowie PR Δ H (hellblau) keine bzw. nur sehr geringe transkriptionelle Aktivität nach Stimulierung mit 10 nM Progesteron (Abb. 15C). PR Δ DBD (orange) war wie erwartet inaktiv bzw., allenfalls bei hohen Progesteron-Konzentrationen, schwach aktiv (Abb. 15C)

Deutlich zu sehen war die hormonunabhängige Aktivität von PR Δ C. Aus der Literatur ist bekannt, dass Trunkationen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des GR (AS 515-Ende) zu einer hormonunabhängigen Aktivität führt (Hollenberg *et al.*, 1987). Später wurde dies auch für den PR beschrieben (Takimoto *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu C-terminalen Trunkation des GR, die zu einer schwächeren Reporter-gen-Expression führt (Hollenberg *et al.*, 1987), war die PR Δ C deutlich aktiver als PR_{wt} (Abb. 15B). Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die stärkere Expression dieses Rezeptors erklären (Abb. 15D, Spur 11-14). Obwohl im Vergleich nur die Hälfte HA-PR Δ C-Plasmid für die Transfektion eingesetzt wurde, war die Proteinmenge deutlich höher als bei PR_{wt} (Abb. 15D, Spur 1-4).

Die Deletion der Hinge-Region im GR führt zu keiner wesentlichen Veränderung der Rezeptor-Aktivität (Hollenberg *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu führte die Deletion der entsprechenden Domäne im PR (Δ H1, Abb. 15B) zu einer bis zu 7-fach höheren Aktivität bei einer Progesteron-Konzentration von 10 nM. Eine ähnliche Verstärkung der Rezeptor-Aktivität war nach Deletion der Reste 494-562 zu beobachten (Abb. 15B). Die Expressionsniveaus der Rezeptoren (Abb. 15E) zeigten für PR Δ H1 (Spur 6-9) im Vergleich zu PR Δ 494-562 (Spur 11-14) etwas höhere Proteinspiegel. Dies könnte der Grund für die etwas geringere Aktivität von PR Δ 494-562 gewesen sein. Da die beiden Mutanten und PR_{wt} auf verschiedene Gele geladen wurden, konnten ihre Expressionsniveaus nicht direkt miteinander verglichen werden. Es wurden jedoch in anderen vergleichenden Expressionsanalysen keine großen Unterschiede in der Proteinmenge zwischen PR_{wt}, PR Δ H1 und PR Δ 494-562 festgestellt (Daten nicht gezeigt). Interessant ist, dass PR Δ H1, verglichen mit PR Δ 494-562, erst bei deutlich höheren Progesteron-Konzentrationen aktiviert wurde.

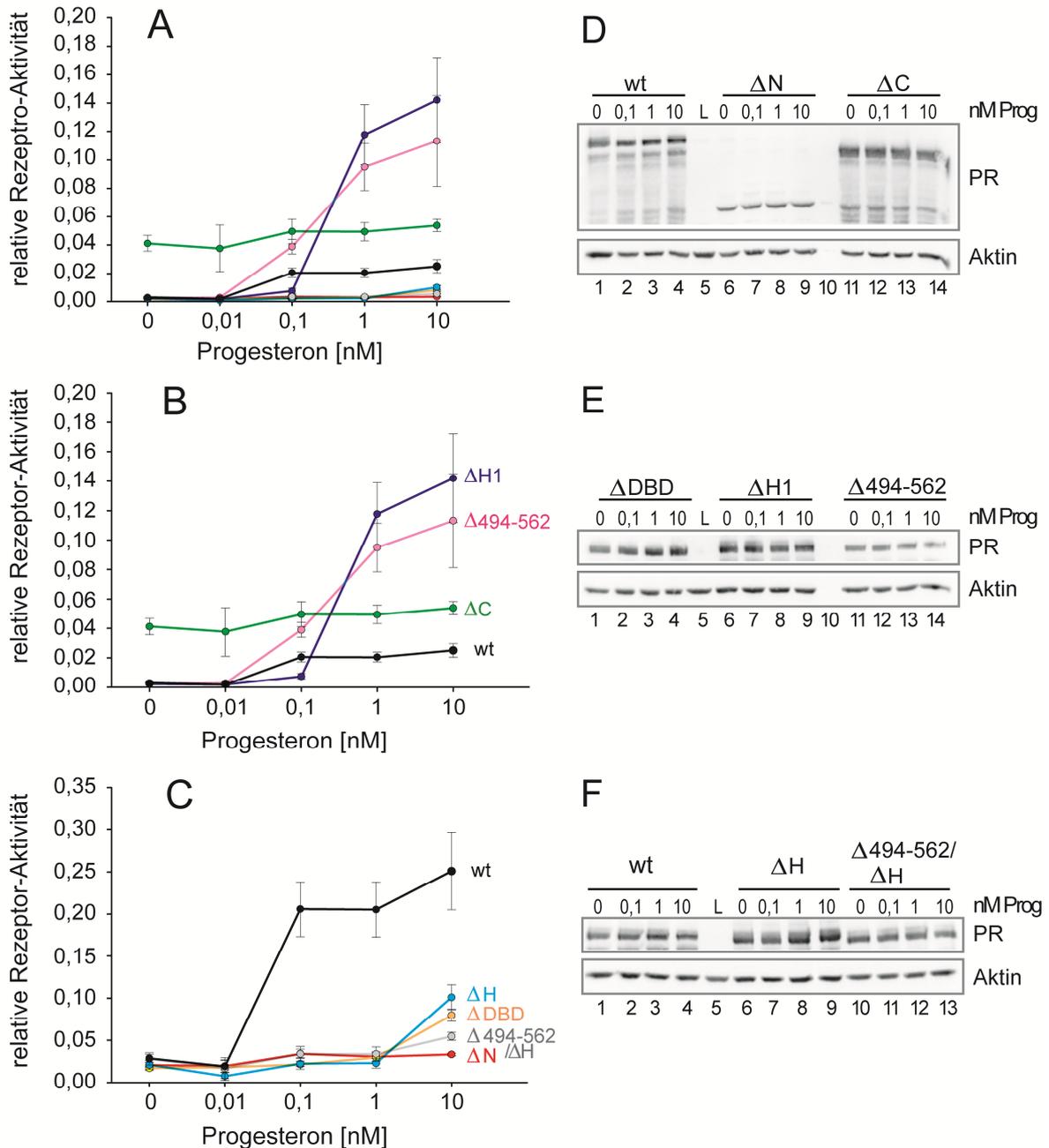


Abbildung 15: Funktionelle Analyse verschiedener PR-Mutanten im Vergleich zu PRwt. 8000 Cos-7 Zellen wurden mit den kodierenden Plasmiden für MMTV-Luc (60 ng), Gaussia-KDEL (5 ng) und einem der Expressionsplasmide für HA-PRwt, HA-PR- Δ H1, HA-PR Δ 494-562, HA-PR Δ H und HA-PR Δ 494-562/ Δ H (jeweils 12,5 ng) cotransfiziert. Für die Analyse von HA-PR Δ C wurden 6 ng, für die von HA-PR Δ N 25 ng Rezeptor-Plasmid transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Rezeptor-Aktivität (*Firefly*/Gaussia, \pm SEM). Für PRwt wurden 6-14 unabhängige Experimente durchgeführt, für die Mutanten 3-7. **(A)** Darstellung der Aktivität aller Rezeptoren. **(B-C)** Aufteilung der Aktivitätsdaten in, verglichen mit dem PRwt (schwarz), aktive Mutanten: PR Δ C (grün), PR Δ 494-562 (rosa) und PR Δ H (blau) **(B)**, und inaktive bzw. schwach aktive Mutanten wie PR Δ N (rot), PR Δ 494-562/ Δ H (grau) PR Δ DBD (orange) und Δ H (hellblau) **(C)**. **(E-F)** Repräsentativer Westernblot mit Extrakten aus den Reporter-Experimenten. Es wurden jeweils 20 μ l auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Für die Westernblot-Analysen wurden Extrakte von Zellen verwendet, die mit Ethanol bzw. 0,1, 1 und 10 nM Progesteron stimuliert wurden. In Spur 5 aller drei Gele wurde der Extrakt untransfizierter Zellen (L) als Kontrolle für die Antikörperspezifität mitgeführt. Die Detektion der Proteine wurde mit Antikörpern gegen HA (PR) und Aktin als Ladekontrolle durchgeführt.

Die Inaktivität der Doppelmutante PR Δ 494-562/ Δ H ließ sich durch die Deletion der Hinge-Region erklären, deren Deletion für sich genommen bereits zur Inaktivierung des Rezeptors führte (Abb. 15C). Als Grund könnte eine Strukturinstabilität bzw. Fehlfaltung angeführt werden. Eine Reduktion der exprimierten Rezeptormenge konnte als Erklärung für die Inaktivität ausgeschlossen werden, da die Rezeptormenge dieser Mutante (PR Δ H) deutlich höher als die des Wildtyps war (Abb. 15F, Spur 6-9 vergl. mit Spur 1-4).

Die Deletion der DNA-Bindungsdomäne führte wie erwartet zum Verlust der transkriptionellen Funktion (Abb. 15C). Die Rezeptor-Expression (Abb. 15E, Spur 1-4) war vergleichbar mit PR Δ H1 (Spur 6-9). Da der Rezeptor nicht mehr DNA binden konnte, wurde die Transkription des Reportergens nicht initiiert. Die Deletion des N-Terminus führte ebenfalls zum Verlust der Transaktivierungsfähigkeit. Dies wurde auch für den GR beschrieben (Hollenberg *et al.*, 1987; Kullmann *et al.*, 1998). Von allen getesteten Mutanten wurde PR Δ N am schwächsten exprimiert (Abb. 15D, Spur 6-9). Dies könnte der Grund für die kaum vorhandene transkriptionelle Aktivität sein. Obwohl auch hier versucht wurde, die Expression durch doppelte Menge Plasmid-DNA anzupassen, wurde das Expressionsniveau des Wildtyps oder das der anderen PR-Mutanten nicht erreicht. Offenbar beeinflusste die Deletion der N-terminalen Aminosäuren auch das Expressionsniveau bzw. die Stabilität des Rezeptors.

4.1.5 Interaktionsprofil von BAG-1M mit den PR-Mutanten – fehlende Interaktion mit PR_DBD

Nach der funktionellen Analyse der PR-Deletionsmutanten wurde die Bindung an BAG-1M in Co-Immünpräzipitations-Experimenten (CoIP) untersucht. HEK 293 Zellen wurden zusammen mit BAG-1M bzw. BAG-1M_mut und den PR-Konstrukten cotransfiziert. Es wurde versucht, die exprimierten Rezeptormengen durch Verwendung unterschiedlicher Plasmidmengen anzupassen. Die meisten Rezeptor-Plasmide wurden allerdings mit 2 μ g transfiziert. Die Präzipitation von Flag-BAG-1M aus dem Zelllysate erfolgte mit anti-Flag-Agarose. Zum definierteren Vergleich der Expression und der präzipitierten Menge an Rezeptor, wurden Lysat und CoIP auf ein Gel geladen. Die Ergebnisse der Bindungsanalyse der aktiven PR-Mutanten sind in Abbildung 16 dargestellt.

Im Gegensatz zu BAG-1M, hat BAG-1M_mut nicht mehr an Hsc70/Hsp70 gebunden (Abb. 16 A und B, Coomassie-Gele). Die Proteine, die in einer schwachen Bande sichtbar copräzipitiert wurden, könnten unspezifische endogene Interaktionspartner sein, da sie auch in der Kontrolle (Abb. 16A, Spur 8) vorhanden waren.

Es gab keinen nennenswerten Expressionsunterschied zwischen PRwt, PR Δ 494-562 und PR Δ H1 in Gegenwart von BAG-1M (Abb. 16A, Spur 2-7). BAG-1M_mut jedoch schien einen „stabilisierenden“ Effekt auf die Rezeptor-Expression zu besitzen, der am stärksten

PRwt und PR Δ 494-562 betraf (Abb. 16A, vgl. Spur 2 mit Spur 3 und Spur 4 mit Spur 5). Allerdings könnte diese Beobachtung auch mit einem Unterschied in der Transfektionseffizienz erklärt werden. Der Wildtyp und die beiden Mutanten PR Δ 494-562 und PR Δ H1 waren in der Lage, an BAG-1M zu binden (Abb. 16A, Spur 9, Spur 11 und Spur 13). Anders als beim GR, führte die Deletion der Hinge-Region des PR nicht zum Verlust der BAG-1M Interaktion. Auch das Fehlen der Reste 494-562 hatte keinen Einfluss auf die Bindung an BAG-1M. PRwt sowie aller hier dargestellter Mutanten interagierten Hsc70/Hsp70-abhängig mit BAG-1M, da sie mit BAG-1M_Mut nicht copräzipitiert wurden (Abb. 16A, Coomassie-Gel: Spur 10, Spur 12 und Spur 14).

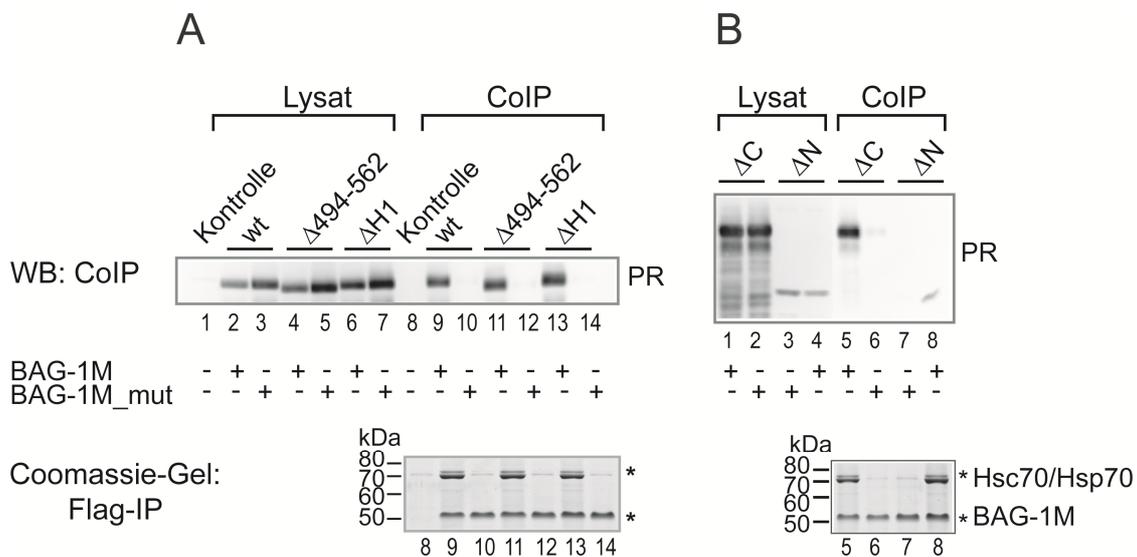


Abbildung 16: Die Bindung der funktionell aktiven PR-Mutanten wird von Hsp70 vermittelt. HEK 293 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Flag-BAG-1M bzw. Flag-BAG-1M_mut (je 8 μ g) und den verschiedenen Rezeptor-Plasmiden cotransfiziert. Flag-BAG-1M wurde mit anti-Flag-Agarose über Nacht präzipitiert. Für die Westernblot-Analyse wurden je 10 μ g Zellextrakt (Lysat) und 5 μ l Eluat (Flag-IP) geladen. Für die Coomassie-Gele wurden 2,5 μ l Eluat geladen. Nach dem Blotten wurden die Rezeptoren mit einem Antikörper gegen HA detektiert. (A) Es wurden jeweils 2 μ g der codierenden Plasmide für HA-PRwt, HA-PR Δ 494-562, HA-PR Δ H mit Flag-BAG-1M und Flag-BAG-1M_mut cotransfiziert. Als Kontrolle der Spezifität der anti-Flag-Agarose wurden 8 μ g eines Expressionsvektors (pRK5-SV40-MCS) transfiziert. (B) Für die Expression von HA-PR Δ C und HA-PR Δ N wurden jeweils 1 μ g bzw. 5 μ g der entsprechenden Rezeptor-Plasmide verwendet. Die Sterne an beiden Coomassie-Gele markieren präzipitiertes Flag-BAG-1M und copräzipitiertes Hsc70/Hsp70.

Obwohl zweimal mehr Plasmid für PR Δ N als für PR Δ C eingesetzt wurde, war die exprimierte Proteinmenge für PR Δ N geringer (Abb. 16B, vgl. Spur 3 und Spur 4 mit Spur 1 und Spur 2). Dennoch wurde für diese Mutante eine Interaktion mit BAG-1M nachgewiesen (Abb. 16B, Spur 8). Die Deletion des C-Terminus des PR (PR Δ C) hatte keinen negativen Einfluss auf die Bindung an BAG-1M (Abb. 16B, Spur 5). In beiden Fällen wurde die Interaktion mit BAG-1M von Hsc70/Hsp70 vermittelt, da die beiden Rezeptor-Mutanten mit

BAG-1M_mut nicht copräzipitiert wurden (Abb. 16B, Coomassie-Gel: vgl. Spur 5 mit Spur 6 und Spur 8 mit Spur 7).

Die Interaktionsanalyse von PR Δ H und PR Δ 494-562/ Δ H zeigte für beide PR-Mutanten eine Hsc70/Hsp70-abhängige Bindung an BAG-1M. Da es sich hierbei um transkriptionell inaktive Mutanten handelte, sind die entsprechenden Daten hier nicht gezeigt. Ein Grund für diese Interaktion könnte sein, dass die Deletion der gesamten Hinge-Region (AS 641-684) eine Fehlfaltung zur Folge hatte, welche die Bindung an Hsc70/Hsp70 in seiner Funktion als Chaperon begünstigte. Dies könnte auch für die BAG-1M-Interaktion der PR-Doppelmutante (PR Δ 494-562/ Δ H) als Erklärung angeführt werden.

Keine der deletierten Regionen im PR schien essentiell für die Bindung an BAG-1M zu sein. Als Erklärung können hier zwei Möglichkeiten angeführt werden. Zum einen könnte mehr als eine Region oder Domäne des PR an der Interaktion mit BAG-1M beteiligt sein. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass z.B. eine Fehlfaltung, bedingt durch die Deletion der gesamten Hinge-Region, zu einer verstärkten Hsc70/Hsp70-Bindung führte. In seiner Eigenschaft als Chaperon, dessen Funktion unter anderem die Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase ist, bindet es an fehlgefaltete Proteine und führt sie dem Abbau zu. Da es sich hier um Überexpressions-Experimente handelte, könnte die Kapazität der am Proteinabbau beteiligten Komponenten jedoch nicht ausgereicht haben, um eine Abbau-bedingte Reduktion der Proteinmenge in der Westernblot-Analyse erkennbar zu machen.

Um zu untersuchen, ob die Hinge-Region bzw. die Reste 494-562 dennoch einen Beitrag zur Bindung an BAG-1M leisten, wurde im nächsten Schritt die Bindung von PR_DBDH und PR_494-641 an BAG-1M untersucht. Auch die Frage nach der Relevanz der DNA-Bindungsdomäne des PR für die BAG-1M-Interaktion wurde in nachfolgenden Experimenten beantwortet (Abb. 17).

Obwohl für die Expression der PR_DBDH-Mutante ebenfalls 5 μ g Plasmid-DNA eingesetzt wurden, um das Expressionniveau anzugleichen, wurde sie schwächer exprimiert als PR_DBD (Abb. 17A, vgl. Spur 3 und Spur 4 mit Spur 1 und 2). Trotz des Expressionsvorteils von PR_DBD, war dieses Fragment nicht in der Lage, an BAG-1M zu binden. Das Anfügen der Hinge-Region in PR_DBDH führte im Gegensatz, zu einer Wiederherstellung der Interaktion mit BAG-1M. BAG-1M_mut hingegen hat an keines der beiden PR-Fragmente gebunden (Abb. 17A, Spur 6 und Spur 8). Damit wurde gezeigt, dass Hsc70/Hsp70 die Bindung von PR_DBDH an BAG-1M vermittelte.

Die Expression von PR_494-641 konnte in diesem Experiment nicht mit der Expression von PR_DBD und PR_DBDH verglichen werden, da beide Mutanten nicht auf dasselbe Gel geladen wurde. In anderen vergleichenden Expressionsanalysen aber wurde festgestellt, dass PR_494-641 ähnlich stark exprimiert wurde wie PR_DBD (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie im Falle der Hinge-Region führte das Anfügen der Reste 494-562 zur Wiederherstellung der Bindung an BAG-1M (Abb. 17B, Spur 3). Da PR_494-641 von BAG-

1M_mut nicht copräzipitiert wurde (Abb. 17B, Spur 4), wurde dadurch die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der Interaktion von PR_494-641 mit BAG-1M erneut bestätigt.

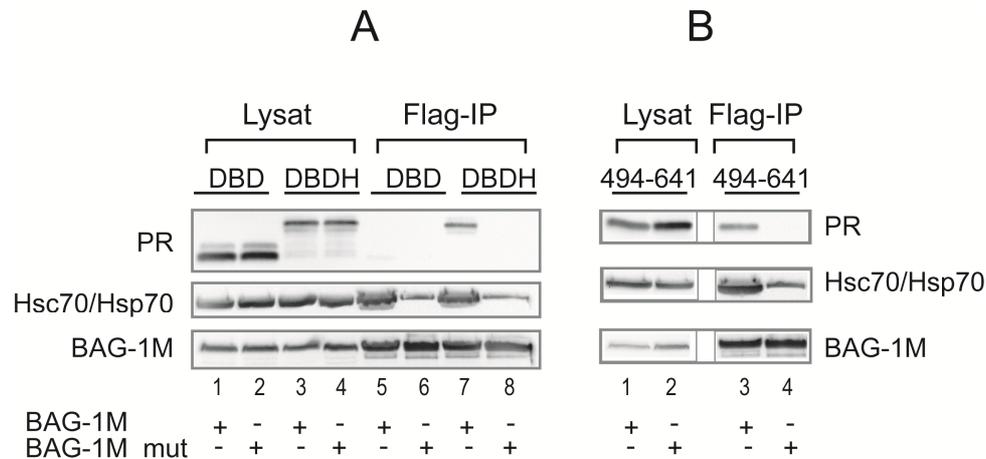


Abbildung 17: Die DNA-Bindungsdomäne des PR bindet nicht an BAG-1M. Die Expressionsplasmide für Flag-BAG-1M oder Flag-BAG-1M_mut (jeweils 8 µg) und eines der Plasmide, kodierend für die verschiedenen PR-Fragmente, wurden zusammen in HEK 293 Zellen transfiziert. Nach der Elution des mit anti-Flag-Agarose präzipitierten Materials wurden für die Westernblot-Analyse jeweils 15 µg Lysat und 20 µl Eluat (Flag-IP) auf ein 15%iges PAA-Gel geladen und nach dem Transfer auf eine Membran mit Antikörpern gegen HA (PR), Hsc70/Hsp70 und BAG-1 detektiert. **(A)** Für die Expression von HA-PR_DBD und HA-PR_DBDH wurden 2 µg bzw. 5 µg Plasmid-DNA in die Elektroporation eingesetzt. **(B)** Für die Transfektion des Expressionsplasmids von HA-PR_494-641 wurden 2 µg verwendet.

Zusammenfassend haben die Daten der Bindungsanalyse gezeigt, dass mit Ausnahme der PR_DBD sowohl der Wildtyp als auch alle PR-Mutanten und –Fragmente an BAG-1M gebunden haben. Anders als beim GR, schien die Hinge-Region des PR nicht essentiell für die Bindung an BAG-1M gewesen zu sein. Sie konnte aber die Bindung der PR_DBD an BAG-1M wiederherstellen. Das Gleiche galt auch für die Reste 494-562. Die Fusion dieser Aminosäure-Reste an die DBD des PR stellte die Interaktion mit BAG-1M wieder her. Die Deletionsmutante PR Δ 494-562 wies eine unveränderte Bindung an BAG-1M auf.

Im Gegensatz zum AR, in dem besonders der N-Terminus, aber auch der C-Terminus zur Bindung an BAG-1M beiträgt, interagierten beide PR-Deletionsmutanten (PR Δ N und PR Δ C) mit BAG-1M.

Diese Daten legten den Schluss nahe, dass mehr als eine Domäne des PR an der Interaktion mit BAG-1M beteiligt ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass jede Bindung der PR-Mutanten an BAG-1M Hsc70/Hsp70 abhängig war. Somit könnte der repressiven Wirkung von BAG-1M auf die PR-Aktivität ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen, als bei der Inhibition der GR-Transaktivierung.

4.1.6 Verlust der Hsc70/Hsp70-Bindung an PR_DBD

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass mit Ausnahme von PR-DBD alle PR-Mutanten Hsc70/Hsp70-abhängig an BAG-1M gebunden haben. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, warum PR_DBD generell nicht an BAG-1M gebunden hatte. Eine Möglichkeit konnte in der fehlenden Interaktion der PR_DBD mit Hsc70/Hsp70 liegen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden erneut Co-Immunpräzitationsexperimente (CoIP) durchgeführt. Hierfür wurden wiederum HEK 293 Zellen verwendet, und mit den Expressionsplasmiden der verschiedenen HA-PR-Konstrukte und der Plasmid-DNA für Flag-BAG-1M oder Flag-BAG-1M_mut cotransfiziert. Dieses Mal wurde der Zellextrakt mit anti-HA-Agarose inkubiert. Nach der spezifischen Elution mit HA-Peptid wurde das präzipitierte Material im Westernblot immunologisch analysiert (Abb. 10).

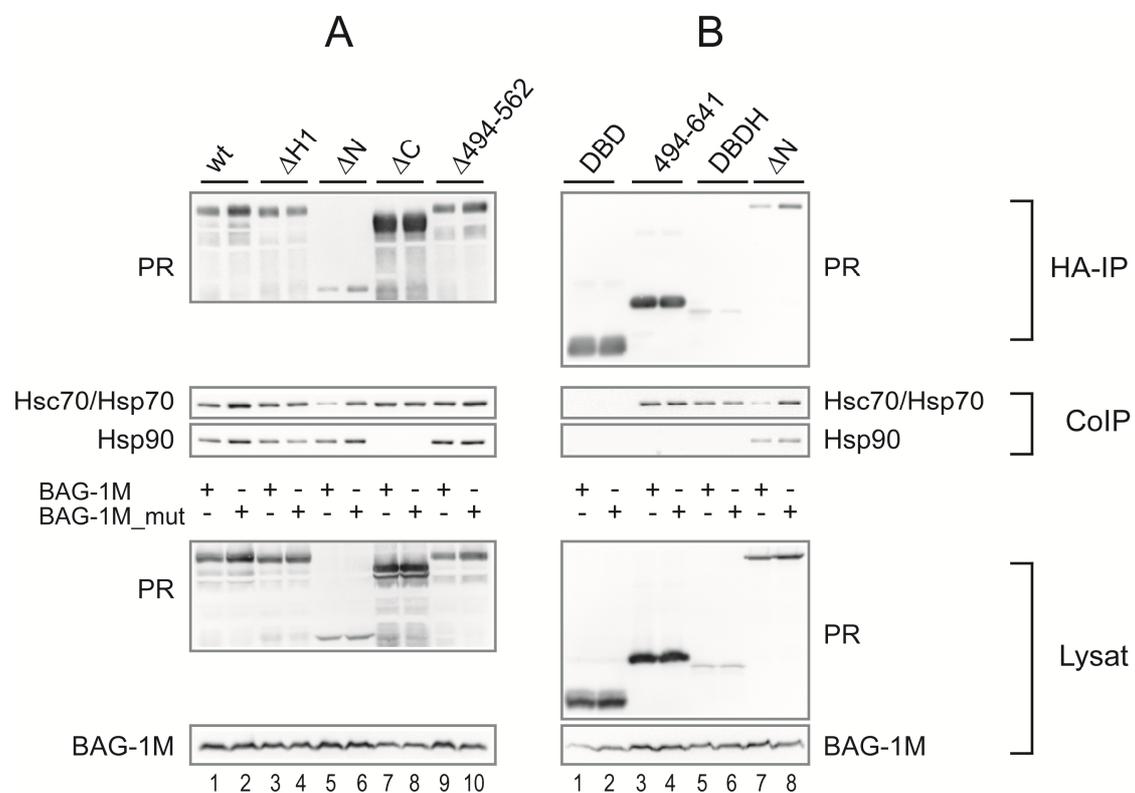


Abbildung 18: Hsp70 bindet nicht an die DNA-Bindungsdomäne des PR. HEK 293 Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden von HA-PRwt bzw. HA-PR-Mutanten (jeweils 8 µg) und Flag-BAG-1M oder Flag-BAG-1M_mut (jeweils 2 µg) cotransfiziert. Für die Westernblot-Analyse wurden jeweils 15 µg Lysat und 10 µl Eluat (HA-IP) auf ein 11%iges PAA-Gel geladen. Die Detektion der einzelnen Proteine erfolgte mit Antikörper gegen Hsp90, Hsp70, Flag (BAG-1M) und HA (PR). **(A)** Westernblot der präzipitierten Rezeptoren HA-PRwt, HA-PR Δ H1, HA-PR Δ N, HA-PR Δ C, HA-PR Δ 494-562 (HA-IP), des copräzipitierten Hsp70 und Hsp90 (CoIP) und der Expressionskontrolle (Lysat). **(B)** Analyse der Immunpräzipitation von HA-PR_DBD, HA-PR_DBDH und HA-PR_494-641 (HA-IP) und des copräzipitierten Hsc70/Hsp70 und Hsp90 (CoIP). Im Lysat wurde die Expression der transfizierten PR-Fragmente und von BAG-1M kontrolliert.

Auch in diesem Experiment wiesen PRwt und PR Δ 494-562 in der Expressionskontrolle in Gegenwart von Flag-BAG-1M_mut etwas erhöhte Proteinspiegel auf (Abb. 18A, Lysat, die Spur 2 und die Spur 10). Obwohl PR Δ N im Vergleich schwach exprimiert wurde, liegt das Expressionsniveau deutlich über dem von PR_DBDH (Abb. 18A, Lysat, vgl. die Spuren 5-6 mit den Spuren 1-4 und den Spuren 7-10 und Abb. 18B, Lysat, vgl. die Spuren 5-6 mit den Spuren 7-8). Dennoch wurde in beiden Fällen die PR-Mutante präzipitiert (Abb. 18A und B, HA-IP, die Spuren 5-6). Die stärkste Expression zeigte PR Δ C, was sich auch in der präzipitierten Proteinmenge widerspiegelte (Abb. 18A, die Spuren 7-8).

Die in Abbildung 18A dargestellte Westernblot-Analyse zeigte, dass Hsc70/Hsp70 mit allen PR-Mutanten einschließlich PRwt copräzipitiert wurde (Abb. 18A, CoIP). Die schwache Hsc70/Hsp70-Interaktion mit PR Δ N in Gegenwart von BAG-1M wurde auf die geringe Menge präzipitierten Rezeptors zurückgeführt (Abb. 18A, Spur 5). Auch PR_494-641 und PR_DBDH interagierten mit Hsc70/Hsp70 (Abb. 18B, CoIP, die Spuren 4-6). PR_DBD war im Gegensatz dazu nicht in der Lage, an Hsp70 zu binden (Abb. 18B, CoIP, die Spuren 1-2).

Interessanterweise wurde mit PR_DBDH, obwohl sehr schwach exprimiert und präzipitiert, eine vergleichsweise große Menge an Hsc70/Hsp70 copräzipitiert.

Ein anderes Bild zeigte sich in der Copräzipitation von Hsp90. Mit der Deletion der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne verlor der PR die Bindungsstelle für Hsp90, wie sie in der Literatur für den GR, PR und ER beschrieben ist (Xu *et al.*, 1998; Carsonjurica *et al.*, 1989; Schowalter *et al.*, 1991; Chambrud *et al.*, 1990) (Abb. 18A, CoIP, vgl. die Spuren 7-8 mit den Spuren 1-2). Weder PR_DBD noch PR_494-641 interagierten mit Hsp90 (Abb. 18B, CoIP, die Spuren 1-7). Im Falle von PR_DBDH musste die geringe Menge an präzipitiertem Protein berücksichtigt werden. Aber auch wenn Hsp90 vergleichbar gut an dieses Fragment gebunden hätte, wie an PR Δ N, wäre es aller Wahrscheinlichkeit nach nicht detektierbar gewesen.

Für die Überprüfung der Bindung von BAG-1M an PRwt und die PR-Mutanten wurden PAA-Gele mit der doppelten Menge desselben Eluats geladen, mit kolloidal Coomassie gefärbt und anschließend im Westernblot analysiert. Die Coomassie-Gele und dazugehörigen Westernblots sind in Abbildung 19 zu sehen.

Das Coomassie-Gel zeigte ähnliche Verhältnisse der präzipitierten Mengen der PR-Konstrukte (Abb. 19, graue Pfeile) wie die Westernblot-Analyse (Abb. 18). PR Δ C ist der Rezeptor, der am stärksten angereichert wurde (Abb. 19A, die Spuren 7-8). Trotz des geringen Expressionsniveaus von PR Δ N und PR_DBDH waren beide Proteine im Coomassie-Gel detektierbar (Abb. 19A und B, die Spuren 5-6).

Hsc70/Hsp70 (Abb. 19, schwarzer Pfeil) wurde mit PRwt und allen PR-Mutanten, mit Ausnahme von PR_DBD, sichtbar copräzipitiert (Abb. 19A die Spuren 1-10 und B, die Spuren 3-6). Im Coomassie-Gel wurde die vergleichsweise starke Copräzipitation von Hsc70/Hsp70 mit PR_DBDH noch deutlicher (Abb. 19B, Spur 5-6).

Die Hsp90-Bande (Abb. 19, Stern) war nur in den Ansätzen mit PRwt, PR Δ H1, PR Δ N und PR Δ 494-562 zu sehen (Abb. 19A, die Spuren 1-6 und die Spuren 9-10).

BAG-1M interagierte auch in diesen Experimenten mit PRwt und allen PR-Mutanten, mit Ausnahme von PR_DBB. Die schwache Anreicherung von BAG-1M mit PR Δ N wurde auf die geringe Menge präzipitierten Rezeptors zurückgeführt (Abb. 19A, Spur 5). BAG-1M_mut hingegen hat an keines der PR-Konstrukte gebunden.

Da PR-DBD die einzige PR-Mutante war, die nicht mit Hsc70/Hsp70 interagierte, ließen die Ergebnisse dieser Experimente die Schlussfolgerung zu, dass die Bindung von Hsc70/Hsp70 an den PR und die hier getesteten Mutanten essentiell für die Interaktion mit BAG-1M ist.

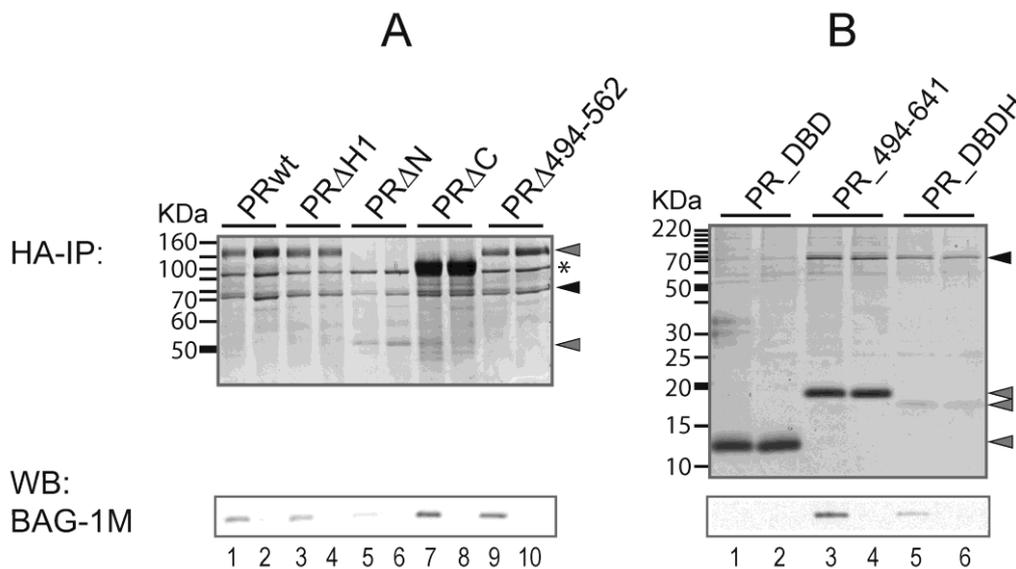


Abbildung 19: Hsp70 ist essentiell für die Bindung von BAG-1M an PRwt und die PR-Mutanten. Es wurden 20 μ l desselben Eluats wie in Abbildung 18 auf ein 11%iges bzw. 15%iges PAA-Gel geladen. Nach dem Färben mit kolloidal Comassie wurden die Gele auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und BAG-1M wurde mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop detektiert. Die grauen Pfeile zeigen die Höhe der Rezeptor-Banden an. Der schwarze Pfeil markiert die Höhe von Hsc70/Hsp70, der Stern die von Hsp90.

4.2 Vergleich von BAG-1M und HspBP1 bezüglich Ihrer Wirkung auf Funktion und Interaktion mit verschiedenen Steroidhormonrezeptoren und faltungsrelevanten Cofaktoren

Der Einfluss von BAG-1 auf den AR, ER und GR wurde in den vergangenen Jahren in vielen Studien untersucht (Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003; Cutress *et al.*, 2003; Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003). Überraschenderweise konnte bisher kein Einfluss von BAG-1 auf den Mineralokortikoidrezeptors (MR) festgestellt werden (Schneikert *et al.*, 1999). In der Literatur gilt BAG-1M daher als Diskriminationsfaktor zwischen GR und MR (Crocoll *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu BAG-1 ist über das Hsp70 bindende Protein 1 (HspBP1) weit weniger bekannt. Beide Proteine sind Hsc70/Hsp70-Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) und können die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 modulieren. Somit stellte sich die Frage, ob HspBP1 einen vergleichbaren Effekt auf SR ausübt wie BAG-1.

Im Zusammenhang mit der in depressiven Patienten beobachteten Glukokortikoid-resistenz, die auf eine beeinträchtigte Funktion der Kortikosteroidrezeptoren hinweist (Holsboer, 2000), ist der GR-Inhibitor BAG-1M die Isoform der Wahl für einen funktionellen Vergleich mit HspBP1. Die Fähigkeit von BAG-1M verwandte SR auf unterschiedliche Weise zu modulieren, veranlasste die Frage, ob etwaige Unterschiede in der Wirkung von BAG-1M und HspBP1 auf die Signaltransduktion von SR feststellbar sind. Als Vergleichsmodell für eventuelle Unterschiede der mechanistischen Grundlage diente die transkriptionelle Aktivität der drei Rezeptoren GR, MR und AR. Der GR repräsentierte den inhibitorischen Einfluss von BAG-1M. Mit dem AR wurde ein Rezeptor ausgewählt, auf den BAG-1M bisher keinen Einfluss gezeigt hatte, im Gegensatz zu der Isoform BAG-1L. Der MR wurde im Hinblick auf die Hypothese, dass eine Störung des MR-GR Gleichgewichts zu psychiatrischen Erkrankungen beitragen kann (de Kloet & DeRijk, 2004), in diese Untersuchung mit einbezogen.

4.2.1 Strategien zur Untersuchung der mechanistischen Grundlagen der Wirkung von BAG-1M und HspBP1

Es wurden parallel verschiedene Strategien verfolgt, um gegebenenfalls vorhandene Unterschiede zwischen BAG-1M und HspBP1 festzustellen und zu untersuchen.

Ein Ansatzpunkt war, neue bzw. weitere Interaktionspartner von HspBP1 und BAG-1M zu finden. Als Methode wurden Co-Immunpräzipitations-Experimente, Coomassie-Gel-Analysen gefolgt von massenspektrometrischen Analysen gewählt. Da bisher alle HspBP1-Interaktionen als Hsc70/Hsp70-abhängig beschrieben wurden, und diese Studie auch direkte Bindungspartner miteinschließen sollte, wurde eine Hsc70/Hsp70-Interaktionsmutante kloniert. Es wurden die Reste A137 und K249 durch Arginin bzw. Alanin ausgetauscht (Shomura *et al.*, 2005), um HspBP1_mut zu generieren. Die Mutation der entsprechenden Reste im Hefe-Ortholog Fes1 führte zum vollständigen Verlust der Bindung an Ssa1p, dem Hsp70-Homolog der Hefe (Shomura *et al.*, 2005). Um mögliche Unterschiede bezüglich der Bindungspartner von HspBP1 und BAG-1M feststellen zu können, und um weitere, nicht Hsc70/Hsp-70 vermittelte Interaktionspartner zu finden, wurde neben BAG-1M auch BAG-1M_mut (siehe 4.1) mitgeführt.

Im nächsten Schritt wurde, unter Einbeziehung der Ergebnisse dieser Interaktionsstudie, mittels Reportergergen-Experimenten der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Funktion von GR, MR und AR verglichen.

In einer dritten Versuchsreihe wurde untersucht, ob sich HspBP1 und BAG-1M durch ihre Funktion als Hsc70/Hsp70-NEF in der Bindung von GR, MR und AR wie auch faltungsrelevanter Cofaktoren unterscheiden. Die Resultate dieser Experimente führten zu weiteren Fragen bezüglich der möglichen Folgen eines mechanistischen Unterschieds in der Wirkung von HspBP1 und BAG-1M auf Hsc70/Hsp70 und seine Bindung an Klienten-Proteine. Für die Beantwortung dieser Fragen wurde eine Methode entwickelt, die am Beispiel des GR Aussagen über den Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Faltung von Hsc70/Hsp70-Klienten-Proteinen zuließen. Eine Methode, festzustellen, ob der GR richtig gefaltet wurde, ist die Messung der Hormonbindung.

4.2.2 Rpt4 und Rpt6: Hsc70/Hsp70-unabhängige Interaktoren von BAG-1M

Zur Identifizierung neuer und Hsc70/Hsp70-unabhängiger Interaktionspartner wurden HspBP1, BAG-1M und die jeweiligen Hsc70/Hsp70-Interaktionsmutanten in Zellen überexprimiert und durch immobilisierte Antikörper präzipitiert. Mögliche Interaktionspartner wurden mittels Coomassie-Färbung im PAA-Gel visualisiert und für die massenspektrometrische Analyse präpariert.

Für die Co-Immunpräzipitationsexperimente wurden HEK 293 Zellen mit den Expressionsplasmiden von Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, und Flag-BAG-1M_mut transfiziert. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung wurde ein zusätzlicher Ansatz Zellen mit derselben DNA-Menge Leervektor (pRK5-SV40-MCS) transfiziert. Alle Transfektionen wurden im Duplikat durchgeführt. Im Anschluss an die Lyse der Zellen wurde der Extrakt mit anti-Flag-Agarose inkubiert. Nach der Elution mit 100 µl Flag-Peptid wurden die jeweils gleichen Eluate vereinigt. Für die Gelelektrophorese wurden 140 µl Probe auf ein geeignetes Volumen reduziert und auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Anschließend wurden die Proteine mit kolloidal Coomassie angefärbt. Unten abgebildet ist das Coomassie-Gel des Co-Immunpräzipitationsexperimentes (Abb. 20).

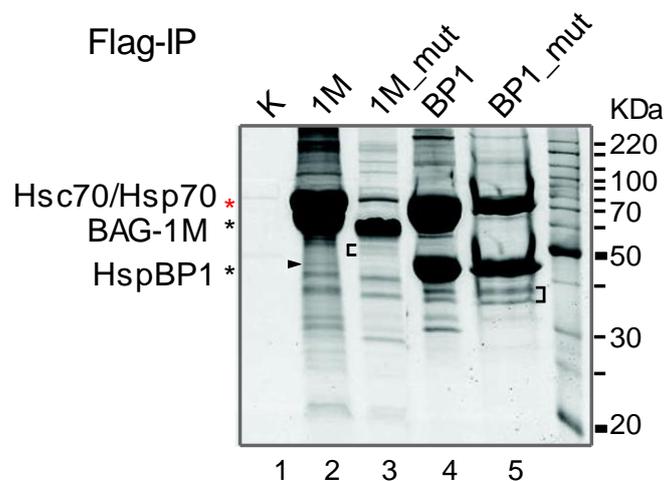


Abbildung 20: Coomassie-Gel der Flag-Immunpräzipitation von BAG-1M und HspBP1. HEK 293 Zellen wurden in zwei Ansätzen mit jeweils 8 µg Plasmid-DNA, die für Flag-BAG-1M (1M), Flag-BAG-1M_mut (1M_mut), Flag-HspBP1 (BP1) und Flag-HspBP1_mut (BP1_mut) codieren, transfiziert. Als Kontrolle (K) für die Antikörperspezifität wurde für die Transfektion dieselbe Menge eines Leervektors (pRK5-SV40-MCS) verwendet. Nach der Lyse wurden die Zellextrakte mit anti-Flag-Agarose inkubiert und anschließend eluiert. Das präzipitierte Material wurde auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Die Proteine wurden mittels kolloidal Coomassie detektiert. Der rote Stern markiert die erwartete Größe von Hsc70/Hsp70, die beiden schwarzen Sterne die von BAG-1M (Spur 2 und 3) und HspBP1 (Spur 4 und 5). Der schwarze Pfeil (Spur 2) und die Klammern (Spur 3 und Spur 5) markieren fünf massenspektrometrisch analysierte Proteine.

Eine Bande, die mit BAG-1M copräzipitiert wurde, konnte als regulatorische Untereinheit 10 der Serin/Threonin-Protein Phosphatase (PP1) identifiziert werden (Abb. 20,

Spur 2). In einer „*Yeast two Hybrid*“-Analyse wurde gezeigt, dass GADD34, ein zelluläres Stress-Protein, mit BAG-1 interagiert und Hsc70/Hsp70 wie auch hPP1 reversibel mit diesem Komplex assoziiert sind (Hung *et al.*, 2003). Die Verifizierung der PP1-Interaktion bestätigte die Eignung dieses experimentellen Ansatzes. Die Analyse der beiden Banden, die mit BAG-1M_mut copräzipitiert wurden, ergab, dass es sich bei beiden Proteinen um zwei regulatorische Untereinheiten des 26S-Proteasomes handelt, Rpt4 und Rpt6 (Abb. 20, Spur 3, Markierung).

Bei den beiden gekennzeichneten Proteinbanden, die mit HspBP1_mut (Abb. 20, Spur 5) copräzipitiert wurden, handelte es sich um Abbauprodukte von HspBP1. Da beide Banden mit dem anti-Flag-Antikörper präzipitiert wurden, ist eine C-terminale Trunkation wahrscheinlich. Es wurden noch weitere, mit HspBP1 copräzipitierte Banden analysiert. Dabei konnte kein eindeutiger Bindungspartner identifiziert werden.

4.2.3 Verifizierung der Interaktion von Rpt4 und Rpt6 mit BAG-1M

In den folgenden Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde mittels Westernblot-Analyse die Spezifität der Bindung von Rpt4 und Rpt6 an BAG-1M überprüft. Des Weiteren wurde untersucht, ob für diese Bindung die Interaktion von BAG-1M mit Hsc70/Hsp70 nötig ist. HEK 293 Zellen wurden jeweils mit den Expressionsplasmiden für Flag-BAG-1M, Flag-HspBP1, Flag-BAG-1M_mut und Flag-HspBP1_mut transfiziert. Nach der Immunpräzipitation mit anti-Flag-Agarose und der Elution mit Flag-Peptid wurde das präzipitierte Material auf 11%ige PAA-Gele geladen und im Westenblot analysiert (Abb. 21).

Die unterschiedlichen Proteinmengen von BAG-1M und HspBP1 in den Lysaten wurden mit einem Unterschied der Transfektionseffizienz begründet. Allerdings wurden BAG-1M und BAG-1M_mut sowie HspBP1 und HspBP1_mut in vergleichbaren Mengen präzipitiert, wie in den Coomassie-Gelen zu sehen ist (Abb. 21B, Lysat und Flag-IP).

Die Westernblot-Analyse zeigte, dass Rpt4 und Rpt6 spezifisch an BAG-1M, jedoch nicht an HspBP1 gebunden haben (Abb. 21A, die Spuren 2-3 und 21B, Spur 2 und Spur 4). In dem Ansatz mit BAG-1M_mut wurde gezeigt, dass die Bindung von Rpt6 an BAG-1M nicht Hsc70/Hsp70-abhängig war (Abb. 21B, Spur 3, CoIP). Auffällig war, dass mit BAG-1M_mut vergleichsweise mehr Rpt6 copräzipitiert wurde (Abb. 21B, Spur 3, CoIP).

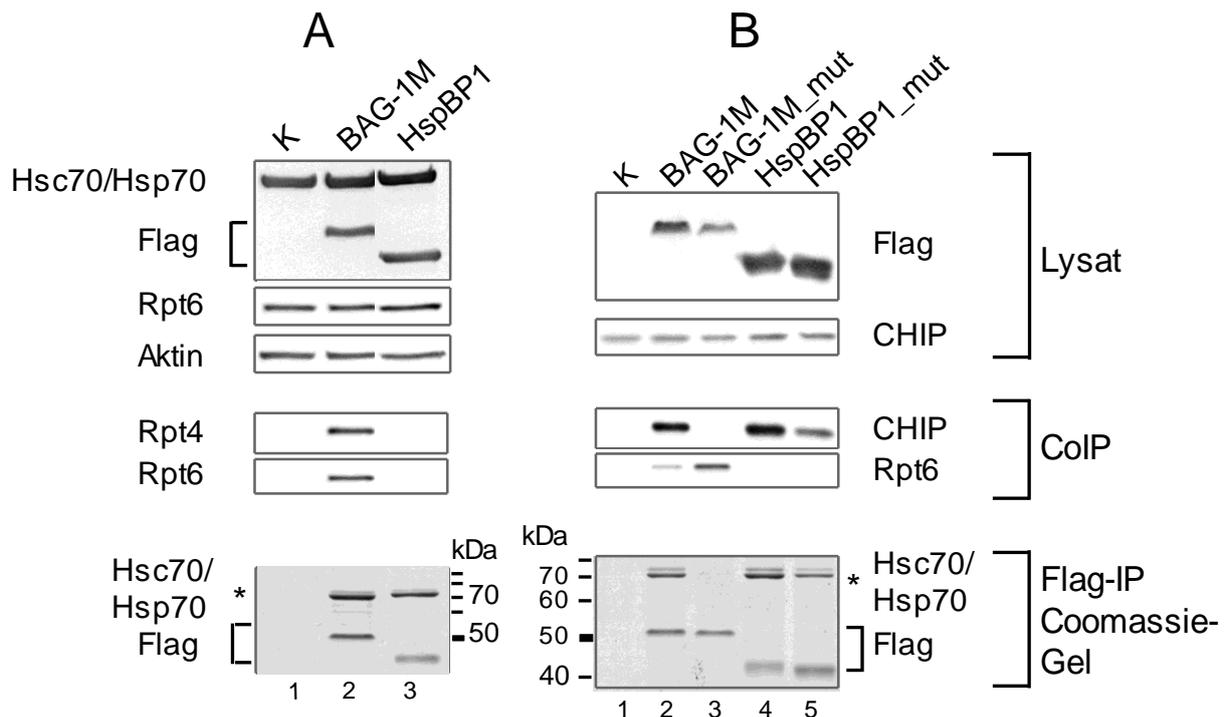


Abbildung 21: Die Bindung von Rpt4 und Rpt6 an BAG-1M ist spezifisch und wird nicht von Hsc70/Hsp70 vermittelt. Es wurden jeweils 8 µg Plasmid-DNA mit den codierenden Sequenzen für Flag-BAG-1M, Flag-HspBP1, Flag-BAG-1M_mut und Flag-HspBP1_mut sowie der gleichen Menge des Leervektors pRK5-SV40-MCS, als Kontrolle (K) für die Antikörperspezifität, in HEK 293 Zellen transfiziert. Die überexprimierten Proteine wurden mit anti-Flag-Agarose präzipitiert und anschließend mit Flag-Peptid eluiert. **(A)** Für die Westernblot-Analyse wurden 15 µg Lysat und 20 µl Eluat (CoIP) auf ein 11%iges PAA-Gel aufgetragen. Für die Detektion im Coomassie-Gel (Flag-IP) wurden 2 µl Eluat auf ein weiteres PAA-Gel geladen. **(B)** Für die Expressionskontrolle wurden 10 µg Lysat und von dem präzipitierten Material 15 µl (CoIP) auf ein 12%iges PAA-Gel aufgetragen. Für die Analyse im Coomassie-Gel wurde ein 12%iges PAA-Gel mit 1,6 µl Eluat (Flag-IP) beladen. Die Detektion der einzelnen Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen das Flag-Epitop (BAG-1M, HspBP1), Hsc70/Hsp70, Rpt4, Rpt6, sowie Aktin und CHIP als Ladekontrolle.

Im Gegensatz zu Rpt6 hat CHIP Hsc70/Hsp70-abhängig an BAG-1M und an HspBP1 gebunden (Abb. 21B, Spur 2 und Spur 4, CoIP). Die im Vergleich schwächere Bindung an HspBP1_mut (Abb. 21B, Spur 5, CoIP) wurde auf die Restbindung von Hsc70/Hsp70 an HspBP1_mut zurückgeführt (Abb. 21B, Spur 5, Flag-IP, siehe auch Abb. 20). Anders als für das Hefe-Homolog Fes1 beschrieben (Shomura *et al.*, 2005), führten die Mutationen der entsprechenden Reste in HspBP1 nicht zum vollständigen Verlust der Hsc70/Hsp70 Interaktion.

Die Bindung von Rpt4 und Rpt6 an BAG-1M war nicht überraschend, da aus der Literatur bekannt ist, dass BAG-1 über die *ubiquitin-like* Domäne (ULD) mit dem 26S-Proteasom interagiert (Lüders *et al.*, 2000a; Alberti *et al.*, 2003a).

Da der GR durch BAG-1 und CHIP, eine E3-Ligase, auf proteasomalem Weg abgebaut werden kann (Demand *et al.*, 2001), stellte sich die Frage, ob der inhibitorische Effekt von BAG-1M auf den GR durch den Abbau des Rezeptors hervorgerufen wird.

Demzufolge müsste sich die Deletion der ULD-Domäne positiv auf die Menge und somit auch auf die Funktion des GR auswirken. Diese Hypothese wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten unter Einbeziehung einer BAG-1M-ULD-Deletionsmutante BAG-1M_Ubidel genauer überprüft.

4.2.4 Kein Verlust der Rezeptorbindung nach Deletion der *ubiquitin-like* Domäne in BAG-1M

Für die Klonierung von BAG-1M_Ubidel wurden durch eine Ligationsreaktion via PCR aus Wildtyp BAG-1M die Aminosäuren 89-134 entfernt. Um diese Mutante auch für Co-Immunpräzipitationsexperimente verwenden zu können, wurde in der PCR-Reaktion an das 5'-Ende die Nukleotidsequenz für die Expression des Flag-Peptids fusioniert.

Mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde die Interaktion von BAG-1M_Ubidel und BAG-1M mit GR, MR und AR verglichen. Die Expressionsplasmide von BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel wurden zusammen mit der Plasmid-DNA von HA-GR, HA-MR und HA-AR in HEK 293 Zellen transfiziert. Die Spezifität der Rezeptor-Bindung wurde in zusätzlichen Kontrollansätzen überprüft. Diese Zellen wurden jeweils mit der Plasmid-DNA für die Expression von HA-GR, HA-MR oder HA-AR und einem leeren Expressionsvektor (pRK5-SV40-MCS) transfiziert. Die Extrakte wurden über Nacht mit anti-Flag-Agarose inkubiert und am nächsten Tag eluiert. Das präzipitierte Material sowie das Lysat wurden im Westernblot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Der Vergleich von BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel im Coomassie-Gel (CG) zeigte, dass BAG-1M_Ubidel mit geringster Effizienz präzipitiert wurde (Abb. 22, A-C, vgl. die Spur mit Spur 6 und Spur 7). Die Westernblot-Analyse (WB) ergab, dass Rpt6 nicht mehr an BAG-1M_Ubidel binden konnte, jedoch an BAG-1M und BAG-1M_mut (Abb. 22A-C, Spur 8). In allen Ansätzen wurde mit BAG-1M_mut vergleichsweise mehr Rpt6 copräzipitiert, als mit BAG-1M (Abb. 22A-C, vgl. Spur 6 und Spur 7). CHIP band vergleichsweise stark an BAG-1M_Ubidel (Abb. 22A-C, vgl. Spur 6 und Spur 8), aber nicht an BAG-1M_mut (Abb. 22A-C, Spur 7). Die schwache Bande in Spur 7 könnte auf unspezifische Hsc70/Hsp70-Bindung an die anti-Flag-Agarose beruhen (Abb. 22B, WB). Hierbei fiel auf, dass im Vergleich zu BAG-1M, mit BAG-1M_Ubidel mehr Hsc70/Hsp70 copräzipitiert wurde (Abb. 22A-C, vgl. Spur 6 und Spur 8, CG). BAG-1M_mut interagierte sehr schwach mit Hsc70/Hsp70 (Abb. 22A-C, Spur 7, CG).

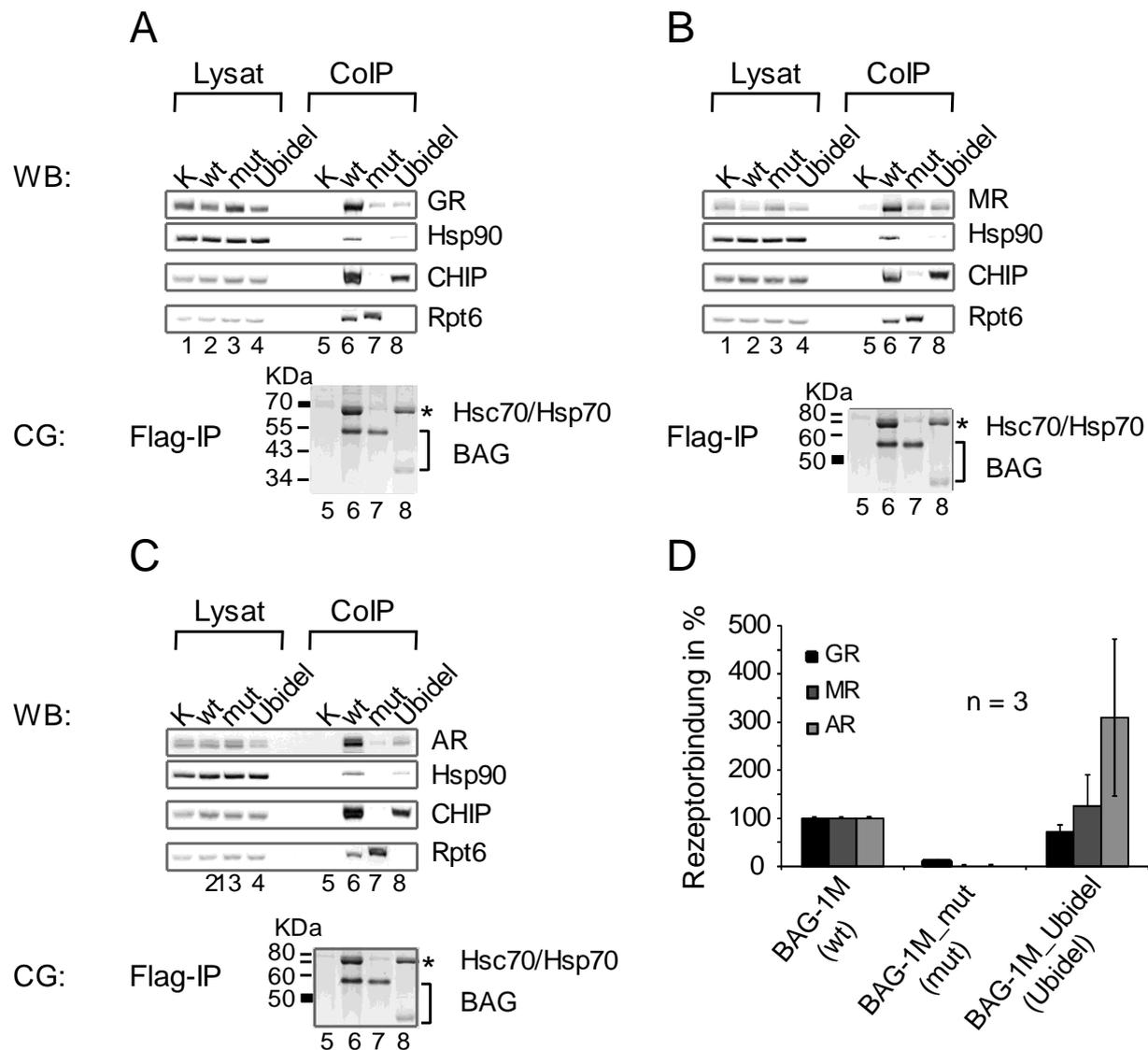


Abbildung 22: GR, MR und AR binden ähnlich stark an BAG-1M_ubidel wie an BAG-1M-Wildtyp. HEK 293 Zellen wurden in getrennten Ansätzen mit den Expressionsplasmiden für Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und Flag-BAG-1M_Ubidel (je 8 µg) sowie mit jeweils 2 µg der codierenden Plasmide für HA-GR, HA-MR oder HA-AR cotransfiziert. Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung wurde in einem zusätzlichen Ansatz anstelle von BAG-1M dieselbe Menge pRK5-SV40-MCS (K) elektroporiert. Nach Bindung an anti-Flag-Agarose und Elution wurden 15 µl des präzipitierten Materials (CoIP) und 10 µg Lysat auf 12%ige PAA-Gele geladen und im Westernblot (WB) immunologisch analysiert. Der GR (A), MR (B) und AR (C) wurden mit anti-HA-HRP detektiert. Für die Visualisierung der endogenen Proteine Hsp90, CHIP und Rpt6 wurden die entsprechenden Antikörper verwendet. Für die Detektion von Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und Flag-BAG-1M_Ubidel mit kolloidal Coomassie wurden jeweils 1,6 µl Eluat auf ein 12%iges PAA-Gel geladen (CG). Die Sterne markieren copräzipitiertes Hsc70/Hsp70. Die Bindung von GR, MR und AR an die BAG-1M-Isoformen aus drei unabhängigen Experimenten wurde quantifiziert. Das Ergebnis ist als Rezeptor-Bindung in % (\pm SEM) dargestellt (D).

Die Rezeptormengen, die mit BAG-1M_Ubidel copräzipitiert wurden, waren deutlich geringer, als jene, die mit BAG-1M angereichert werden konnten (Abb. 22A-C, vgl. Spur 6 und Spur 8). Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Menge an präzipitiertem BAG-

1M_Ubidel zurückzuführen. Sowohl GR, MR als auch AR wurden sehr schwach mit BAG-1M_mut angereichert (Abb. 22A-C, Spur 7, WB). Der Grund hierfür könnte die beobachtete unspezifische Bindung von Hsc70/Hsp70 an die anti-Flag-Agarose gewesen sein.

Mit BAG-1M_Ubidel wurde, vermutlich aufgrund der geringeren Präzipitations-effizienz, deutlich weniger Hsp90 copräzipitiert als mit BAG-1M (Abb. 22A-C, vgl. Spur 6 und Spur 8, WB).

Um herauszufinden, ob es einen Unterschied in der Rezeptor-Bindung zwischen BAG-1M und BAG-1M_Ubidel gibt, wurden die Intensitäten der Rezeptor-Banden densitometrisch analysiert und verglichen (Abb. 22D). Hierfür wurde die Dichte der Bande der copräzipitierten Rezeptoren zur Dichte der Rezeptor-Bande der Lysate ins Verhältnis gesetzt. Dieser Quotient ($\frac{CoIP}{Lys} = X$) wiederum wurde auf die Intensität der Bande der präzipitierten BAG-1M-Isoform normalisiert ($\frac{X}{Flag-IP}$). Als Referenz für die Rezeptor-Bindung diente die Bindung von GR, MR und AR an BAG-1M. Dieser Wert wurde auf 100% festgelegt. Die Quantifizierungen der Rezeptor-Bindung ergaben, dass GR, MR und AR ähnlich stark mit BAG-1M_Ubidel interagierten wie mit BAG-1M (Abb. 22D). Somit hatte die Deletion der UL-Domäne in BAG-1M keinen Einfluss auf das Interaktionspotential mit GR, MR und AR. Im Vergleich banden GR, MR und AR kaum an BAG-1M_mut (Abb. 22D).

4.2.5 Funktionelle Analyse des Einflusses von HspBP1 auf verschiedene Steroidhormonrezeptoren im Vergleich mit BAG-1M

Der Einfluss von HspBP1, HspBP1_mut sowie BAG-1M, BAG-1M_mut, und BAG-1M_Ubidel auf die transkriptionelle Aktivität des GR, MR und AR wurde in Reporter-gen-Experimenten untersucht. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Cos-7 Zellen verwendet, da sie ein etabliertes Zellsystem für die funktionelle Analyse von SR darstellen.

Im Vorfeld wurde abgeklärt, ob die Cofaktoren BAG-1M, BAG-1M_mut, BAG-1M_Ubidel, HspBP1 und HspBP1_mut einen Einfluss auf die häufig als Reporter-gen verwendete *Firefly*-Luciferase haben, da diese ein gängiges Modell für Hsc70/Hsp70-abhängige Faltungsexperimente ist (Abb. 23A). Da die Aktivität der *Firefly*-Luciferase nicht nur von den Cofaktoren beeinflusst werden könnte, sondern auch von der Transfektionseffizienz, wurden die Experimente unter Einbeziehung der *Gussia*-Luciferase, einem Chaperon-unabhängigen Enzym, als Transfektionskontrolle wiederholt (Abb. 23B).

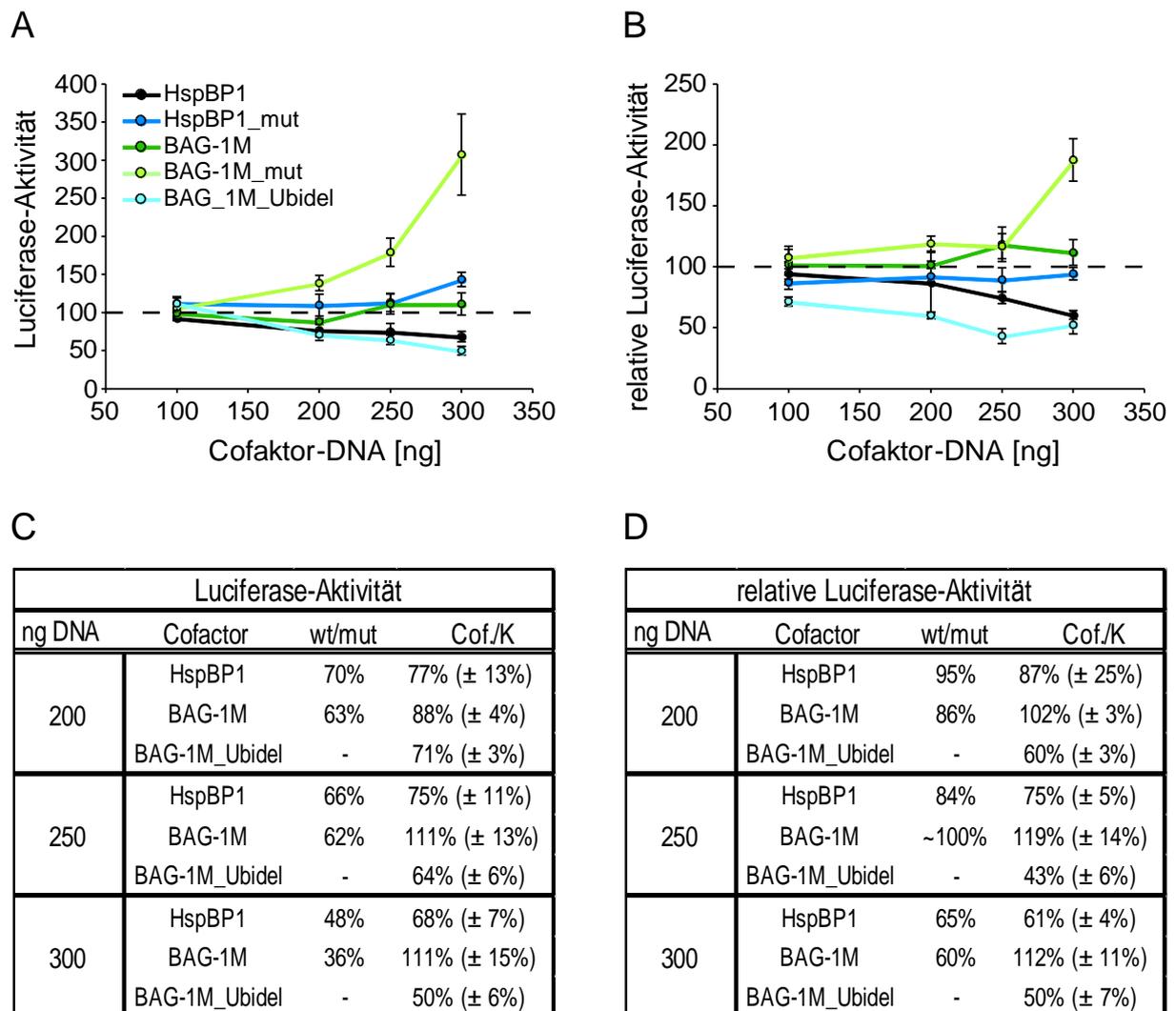


Abbildung 23: Die Cofaktoren zeigen mit Plasmidmengen unter 300 ng keinen Hsc70/Hsp70-abhängigen Einfluss auf die Aktivität der Firefly-Luciferase. 8000 Cos-7 Zellen wurden mit 12,5 ng HA-PR Expressionsplasmid, 100 ng, 200 ng, 250 ng und 300 ng der kodierenden Plasmide für Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und Flag-BAG-1M_Ubidel sowie 2,5 ng eines Plasmids das für HA-Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kodiert, cotransfiziert. Als Kontrolle wurde die entsprechende Menge Leervektor (pRK5-SV40-MCS) verwendet (**A**) Dargestellt sind die Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität (\pm SEM) im Verhältnis zur Kontrolle aus vier unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten. (**B**) Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden zusätzlich 5 ng Gaussia-Expressionsplasmid verwendet. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus vier unabhängigen Experimenten. Die relative Luciferase-Aktivität ist dargestellt als die durch die Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte (\pm SEM) im Verhältnis zu den Werten der Kontrolle. Die Kontrollen wurden in beiden Versuchsreihen pro Experiment 10x mitgeführt. Der Mittelwert der Kontrollen wurde jeweils als Referenzwert auf 100% gesetzt (gestrichelte Linie). (**C und D**) Zusammenfassung der Verhältnisse (in %) der *Firefly*-Aktivität (C) bzw. der relativen *Firefly*-Aktivität (D) von HspBP1, BAG-1M und BAG-1M_Ubidel zu den entsprechenden Mutanten bzw. zur Kontrolle (\pm SEM) aus den Ansätzen mit 200-300 ng transfizierter Cofaktor-Plasmid-DNA.

Cos-7 Zellen wurden mit steigenden Mengen der codierenden Plasmide für Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut, BAG-1M_Ubidel und dem

Expressionsplasmid für die konstitutiv aktive *Firefly*-Luciferase cotransfiziert. Als Kontrolle für die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wurde ein Expressionsvektor (pRK5-SV40-MCS) verwendet. Die *Firefly*-Aktivität in den Kontrollansätzen wurde als Referenz auf 100% festgelegt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 23A dargestellt.

HspBP1 führte mit steigender Plasmidmenge zu einer Hsc70/Hsp70-abhängigen Inhibition der Aktivität der *Firefly*-Luciferase (Abb. 23A). Verglichen mit HspBP1_mut und der Kontrolle wurde die Luciferase-Aktivität in den Ansätzen mit den höchsten Mengen HspBP1-Plasmid-DNA (200-300 ng) um ca. 30-50% inhibiert (Abb. 23C). BAG-1M_mut verstärkte mit zunehmenden Plasmidmengen die *Firefly*-Aktivität. Die Transfektion von 300 ng BAG-1M_mut Plasmid-DNA führte zu einer ca. 3-fach stärkeren Aktivität der *Firefly*-Luciferase als in der Kontrollreaktion (Abb. 23A). Im Verhältnis zu BAG-1M_mut, erreichte die Luciferase in Anwesenheit von 300 ng BAG-1M-Plasmid-DNA nur 36% ihrer Aktivität (Abb. 23A und C). Allerdings zeigte sich in Gegenwart von BAG-1M im Verhältnis zur Kontrolle kein Unterschied in der Luciferase-Aktivität (Abb. 23A und C). BAG-1M_Ubidel hatte den stärksten inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität der *Firefly*-Luciferase (Abb. 23A). BAG-1M_Ubidel führte gegenüber der Kontrollreaktion zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität zwischen 40-60% (Abb. 23A und C).

Im nächsten Schritt wurden dieselben Experimente mit der Gaussia-Luciferase (Gaussia) als Transfektionskontrolle wiederholt und die Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität auf die der Gaussia-Aktivität, normalisiert (Abb. 23B). HspBP1 zeigte jetzt erst ab 250 ng Plasmid-DNA die Tendenz, die *Firefly*-Luciferase Hsc70/Hsp70-abhängig zu inhibieren (Abb. 23B und D). Verglichen mit der Kontrolle zeigte BAG-1M keinen nennenswerten Einfluss auf die *Firefly*-Aktivität. BAG-1M_mut hingegen führte auch hier bei geringeren DNA-Mengen zu einer leichten Stimulierung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität. Bei 300 ng Plasmid-DNA war dieser Effekt am stärksten (Abb. 23B und D). BAG-1M_Ubidel zeigte im Gegensatz zu BAG-1M bereits bei 100 ng Expressionsplasmid einen repressiven Einfluss auf die *Firefly*-Aktivität (Abb. 23B). Mit steigenden Mengen BAG-1M_Ubidel-Plasmid wurde dieser inhibitorische Effekt stärker und erreichte bei 250 und 300 ng ein Maximum von 40-50% (Abb. 23D). Die Transfektion von 200 ng BAG-1M_Ubidel Plasmid-DNA zog bereits eine Inhibition der *Firefly*-Aktivität auf 60% des Kontrollwertes nach sich (Abb. 23B und D).

Diese Experimente zeigten, dass die *Firefly*-Luciferase als Reportergen für die Untersuchung des Einflusses von HspBP1, BAG-1M und BAG-1M_Ubidel auf die Funktion des GR, MR und AR unter Beachtung folgender Punkte geeignet war. Erstens, die maximal verwendete Menge Plasmid-DNA der Cofaktoren sollte 200 ng nicht überschreiten. Bei der Verwendung höherer Plasmidmengen hätte sich die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit einer möglichen Rezeptor-Inhibition nicht mehr von der Inhibition des Reporters unterscheiden lassen. Zweitens, eine eventuell beobachtete Reduktion der Rezeptor-Aktivität auf 60% durch

BAG-1M_Ubidel ist auf den negativen Effekt der Mutante auf die Reporter-gen-Aktivität zurückzuführen. Drittens, es empfiehlt sich die Verwendung der Gaussia-Luciferase als Transfektionskontrolle.

a) HspBP1 inhibiert die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoidrezeptors Hsc70/Hsp70-abhängig, ähnlich wie BAG-1M

Unter der Verwendung steigender Plasmidmengen für jeden Cofaktor wurde in der ersten Versuchsreihe überprüft, ob es in Abhängigkeit der DNA-Menge, Unterschiede zwischen HspBP1, HspBP1_mut, BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel in ihrer Wirkung auf die GR-Aktivität gab. Für die transkriptionelle Aktivierung des GR wurde mit 10 nM Kortisol eine subsaturierende Hormonkonzentration gewählt, da etwaige Einflüsse auf die Hormonaffinität mit sättigenden Hormonkonzentrationen nicht sichtbar sind. In einem zweiten Ansatz wurde untersucht, ob der Einfluss der Cofaktoren auf die GR-Aktivität unter Umständen von der Hormonkonzentration abhängig war. In diesen Experimenten wurde eine konstante Menge Plasmid-DNA für alle Cofaktoren verwendet.

Cos-7 Zellen wurden jeweils mit verschiedenen Mengen der Expressionsplasmide für Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut, Flag-BAG-1M_ubidel oder teilweise nur mit Klonierungsvektor (pRK5-SV40-MCS) zusammen mit dem Reporter-Plasmid MMTV-Luc und der Plasmid-DNA, die für die Gaussia-Luciferase kodiert, cotransfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 10 nM Kortisol oder mit steigenden Kortisolkonzentrationen (0-100 nM) stimuliert. Für die unstimulierten Werte wurden die Zellen mit der gleichen Menge Lösungsmittel (Ethanol) behandelt. Der Einfluss der Cofaktoren auf die transkriptionelle Aktivität des GR in Abhängigkeit ihrer Plasmidmenge bzw. in Abhängigkeit der Hormonkonzentration ist in Abb. 24A und 24B dargestellt.

HspBP1 führte mit steigenden Mengen Plasmid-DNA zu einer starken Inhibition der GR-Aktivität (Abb. 24A). In den Ansätzen mit jeweils 150 ng und 200 ng DNA zeigte sich eine deutliche Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit verglichen mit HspBP1_mut. Allerdings schien HspBP1_mut im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls einen negativen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des GR auszuüben. Dieser inhibitorische Effekt von HspBP1_mut war wahrscheinlich in der Restbindung von Hsc70/Hsp70 an HspBP1_mut begründet (vgl. 4.2.3, Abb. 21B). Die Westernblot-Analyse zeigte, dass sich die steigenden Plasmidmengen von HspBP1 und HspBP1_mut in einer Zunahme der Proteinexpression widerspiegelten und beide Proteine vergleichbare Expressionsniveaus aufwiesen (Abb. 24C). Die GR-Spiegel in Gegenwart von HspBP1 schienen etwas niedriger zu sein, was eine Erklärung für die geringere Rezeptor-Aktivität sein könnte. Allerdings wurde der GR in den Ansätzen mit 150 ng bzw. 200 ng Plasmid-DNA, in denen sich die stärkste Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit zeigte, in Anwesenheit von HspBP1 und HspBP1_mut ähnlich stark exprimiert (Abb. 24C).

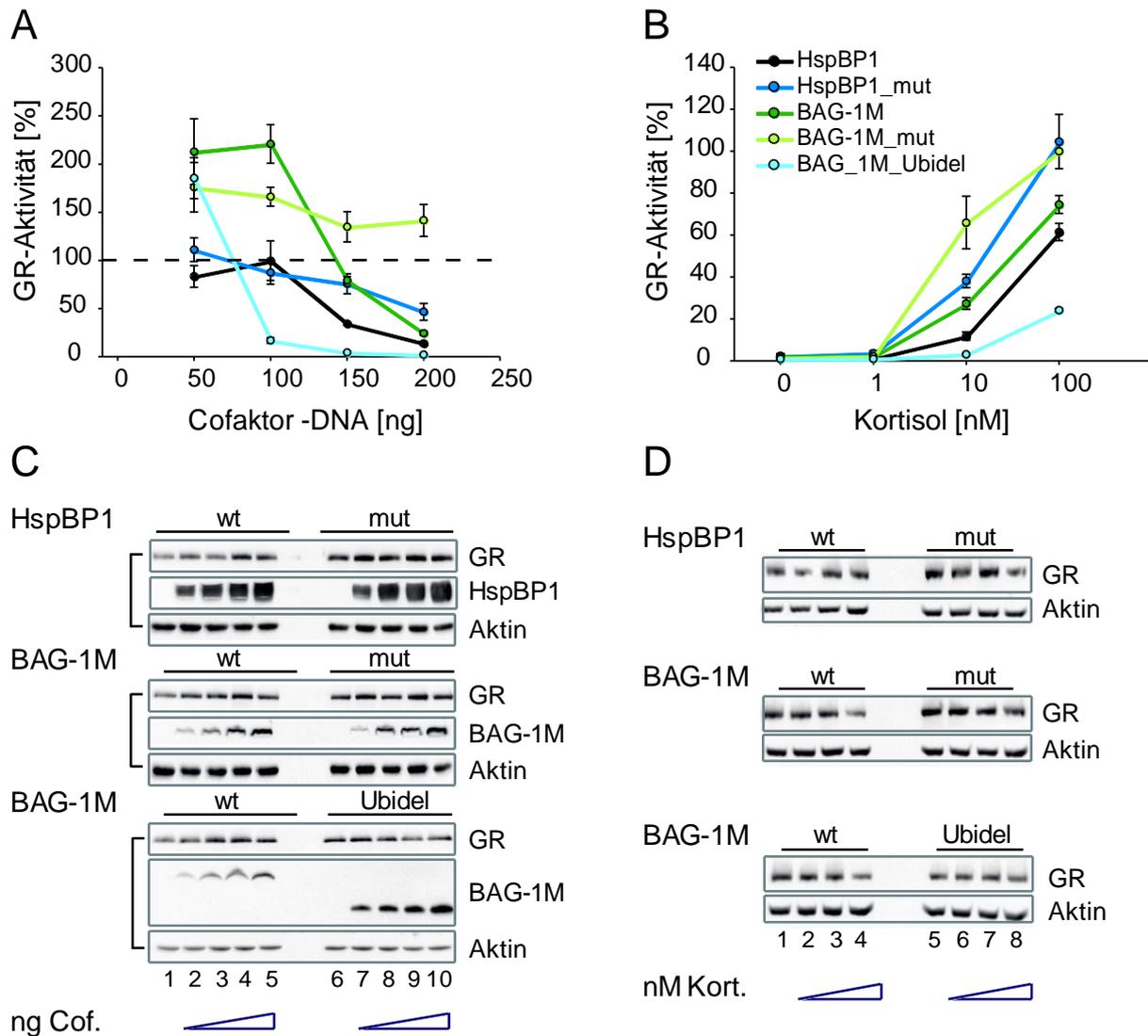


Abbildung 24: HspBP1 und BAG-1M inhibieren den GR in Abhängigkeit ihrer Proteinmenge und der Hormonkonzentration. 8000 Cos-7 Zellen wurden mit 60 ng MMTV-Luc Reporterplasmid, dem Expressionsplasmiden für Gaussia-KDEL (5 ng) und HA-GR (12,5 ng), sowie unterschiedlichen Mengen Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und Flag-BAG-1M_Ubidel (Cofaktoren) cotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit Hormon behandelt. Es wurden jeweils vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. **(A)** Für die Transfektion wurden jeweils 50, 100, 150 und 200 ng der Expressionsplasmide der Cofaktoren transfiziert. Als Kontrolle wurden 200 ng Klonierungsvektor (pRK5-SV40-MCS) verwendet. Die Stimulierung erfolgte mit 10 nM Kortisol für 24 h. Die relative GR-Aktivität ist dargestellt als die durch die Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte (\pm SEM) im Verhältnis zu den Werten der Kontrolle. Die Werte der Kontrolle (kein Cofaktor) wurden als Referenz auf 100% festgelegt (gestrichelte Linie). **(B)** Es wurden 200 ng der Plasmid-DNA jedes Cofaktors transfiziert. Die Hormonbehandlung erfolgte mit 0, 1, 10 und 100 nM Kortisol (Kort) für 24 h. Dargestellt sind die normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte (\pm SEM) im Verhältnis zu BAG-1M_mut als relative GR-Aktivität. Der Wert von BAG-1M_mut bei 100 nM Kortisol wurde als Referenz auf 100% festgelegt. **(C und D)** Repräsentative Westernblots. Für die Westernblot-Analysen wurden jeweils 20 μ l Probe auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Die verschiedenen Proteine wurden mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (GR), das Flag-Epitop (Cofaktor) und Aktin als Ladekontrolle detektiert.

Die BAG-1M-Isoformen, BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel, führten bei 50 ng Plasmid-DNA, verglichen mit der Kontrolle, zu einer deutlichen Stimulierung der GR-abhängigen Transkription (Abb. 24A). BAG-1M stimulierte die Rezeptor-Aktivität in den Ansätzen mit 50 ng und 100 ng Plasmid-DNA. Erst bei höheren DNA-Mengen führte es zur Inhibition der GR-Funktion. Bei 200 ng Plasmid-DNA hatte BAG-1M den stärksten repressiven Einfluss auf die GR-Aktivität (Abb. 24A). Da BAG-1M_mut in allen Ansätzen die GR-abhängige Transkription förderte, war die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit bei 200 ng Plasmid-DNA am deutlichsten sichtbar (Abb. 24A).

Auch für den stimulatorischen Effekt in Gegenwart geringerer Mengen BAG-1M-Plasmid leitete sich eine Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit ab (Abb. 24A). BAG-1M_Ubidel hingegen führte ab einer Plasmidmenge von 100 ng zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der GR-Funktion, die in einer fast vollständigen Inhibition der transkriptionellen Aktivität bei maximaler DNA-Menge mündete. Der beobachtete Effekt kann auf eine Inhibition der GR-Funktion zurückgeführt werden, da er stärker war als der beobachtete Effekt auf die *Firefly*-Luciferase (vgl. Abb. 23B und D). Die Westernblot-Analyse ergab, dass die Proteinspiegel aller drei BAG-1M-Isoformen mit steigenden Mengen der Expressionsplasmide zunahmen (Abb. 24C). BAG-1M und BAG-1M_mut wiesen gleich starke Expressionsniveaus auf, BAG-1M_Ubidel wurde im Vergleich zum Wildtyp etwas stärker exprimiert. Weder BAG-1M oder BAG-1M_mut noch BAG-1M_Ubidel hatten einen sichtbaren Einfluss auf die GR-Expression (Abb. 24C).

In diesen Experimenten war der inhibitorische Effekt wie auch dessen Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit in den Ansätzen mit 200 ng Cofaktor-Plasmid am deutlichsten erkennbar. In der nächsten Versuchsreihe wurden daher für jeden Cofaktor 200 ng Expressionsplasmid verwendet. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit steigenden Kortisolkonzentrationen. Die unter diesen Bedingungen beobachtete Wirkung der Cofaktoren auf die GR-abhängige Transkription der Luciferase ist in Abbildung 24B graphisch dargestellt. Als Referenzwert von 100% wurde die GR-Aktivität in Gegenwart von BAG-1M_mut bei 100 nM Kortisol verwendet, da BAG-1M_mut bekanntermaßen keinen Einfluss auf die GR-Aktivität hat.

HspBP1 führte, ähnlich wie BAG-1M, zu einer Inhibition der GR-Transaktivierung (Abb. 24B). Die stärkste Inhibition durch HspBP1 und BAG-1M wurde bei 10 nM Kortisol beobachtet. In Anwesenheit von 100 nM Kortisol nahm der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die GR-Aktivität ab (Abb. 24B). In beiden Fällen zeigte sich die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit dieses Effektes bei 10 und 100 nM Hormon. HspBP1_mut wies bei 10 nM Kortisol einen vergleichsweise schwachen inhibitorischen Effekt auf die GR-Funktion auf, der jedoch bei 100 nM Kortisol nicht mehr erkennbar war (Abb. 24B). Als Erklärung wurde wiederum die Restbindung von Hsc70/Hsp70 angeführt (vgl. 4.2.3, Abb. 21B). BAG-1M_Ubidel führte auch unter diesen Bedingungen zur stärksten Reduktion der GR-Transaktivierung. Bei 10 nM war der GR transkriptionell fast vollständig inaktiv (Abb. 24B). Nach der Stimulierung mit 100 nM Kortisol erreichte der GR ca. 30% seiner Aktivität

verglichen mit BAG-1M_mut (Abb. 24B). Ein Vergleich der Protein-Spiegel des GR zeigte, dass das Expressionsniveau zwischen HspBP1 und HspBP1_mut vergleichbar war (Abb. 24D). Das Gleiche galt für BAG-1M und die beiden Mutanten, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel (Abb. 24D).

Diese Daten zeigten, dass HspBP1 unter bestimmten Bedingungen einen ähnlichen Hsc70/Hsp70-abhängigen inhibitorischen Effekt auf die GR-Funktion hatte wie BAG-1M. Im Gegensatz zu HspBP1 führte BAG-1M allerdings in geringen Mengen zu einer Stimulierung des GR. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl die Menge der Cofaktoren selbst, als auch die Hormonkonzentration das Ausmaß der GR-Inhibition beeinflussten. Je mehr Cofaktor im Verhältnis zum GR, desto stärker wurde die GR-Aktivität reduziert. Auf der anderen Seite nahm der inhibitorische Einfluss mit steigenden Kortisolkonzentrationen ab. Unter subsaturierenden Bedingungen hatten HspBP1 und BAG-1M den stärksten reprimierenden Effekt auf die GR-Funktion. Überraschenderweise führte BAG-1M_Ubidel zu einer drastischen Reduktion der GR-Aktivität, die sich nicht mit einer verminderten GR-Expression erklären ließ.

b) BAG-1M und HspBP1 inhibieren die Transaktivierungsaktivität des Mineralokortikoid-rezeptors

Der MR ist der interessanteste Kandidat für eine vergleichende Studie der beiden Hsc70/Hsp70-Nukleotidaustauschfaktoren HspBP1 und BAG-1M. Bislang galt BAG-1 als Diskriminationsfaktor für die beiden am nächsten verwandten SR GR und MR (Crocoll *et al.*, 2000). Aus diesem Grund schien er ein geeignetes Modell zu sein, gegebenenfalls vorhandene Unterschiede in der Wirkung von HspBP1 und BAG-1M auf transkriptionelle Aktivität von SR zu untersuchen. Für die funktionelle Analyse des MR wurden Reporter-gen-Experimente wie in 3.2.5a beschrieben in Cos-7 Zellen durchgeführt. Der Effekt von HspBP1, HspBP1_mut, BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel auf den MR wurde ebenfalls in Abhängigkeit der Cofaktor-Plasmidmenge wie auch in Abhängigkeit der Hormonkonzentration untersucht und verglichen. Da der MR, anders als der GR, bereits ohne Hormonbehandlung eine hohe Basalaktivität aufwies, wurde für die Transfektion und Stimulierung der Zellen der nachfolgenden Experimente Medium mit 0,5% statt mit 10% steroidfreiem FBS verwendet. Um das Expressionsniveau des MR anzupassen, wurde die doppelte Menge des Expressionsplasmids von HA-MR (25 ng) transfiziert. Die Stimulierung des MR erfolgte, wie auch in 4.2.5a beschrieben, mit einer konstanten Fludrokortisonkonzentration von 0,03 nM oder mit steigenden Konzentrationen (0-3 nM).

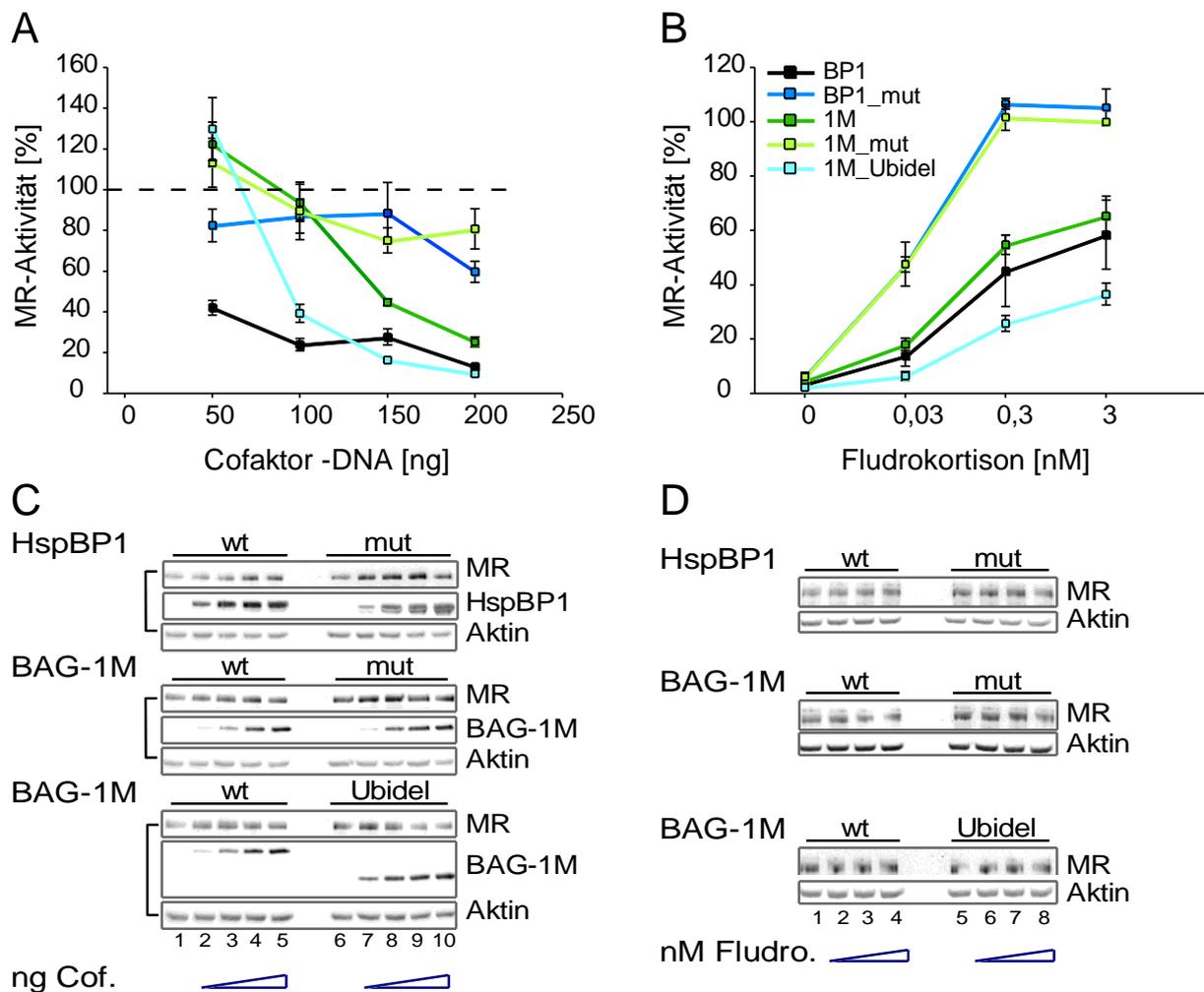


Abbildung 25: Mit steigender Proteinmenge und sinkender Hormonkonzentration inhibieren HspBP1 und BAG-1M die MR-Aktivität. 8000 Cos-7 Zellen wurden mit 60 ng MMTV-Luc Reporter-Plasmid, den Expressionsplasmiden von Gaussia-KDEL (5 ng) und HA-MR (25 ng) und verschiedenen Mengen der Plasmide, die für die Cofaktoren kodieren, sowie teilweise mit dem Expressionsvektor pRK5-SV40-MCS (Kontrolle) transfiziert. Das Medium für die Transfektion und Stimulierung der Zellen enthielt 0,5% steroidfreies FBS. Es wurden jeweils vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. **(A)** Es wurden je 50, 100, 150 und 200 ng der Plasmid-DNA von Flag-HspBP1 (BP1), Flag-HspBP1_mut (BP1_mut), Flag-BAG-1M (1M), Flag-HBAG-1M_mut (1M_mut) und Flag-BAG-1M_Ubidel (1M_Ubidel) (Cofaktoren) transfiziert. Die Stimulierung erfolgte mit 0,03 nM Fludrokortison (Fludro.) für 24 h. Die relative MR-Aktivität ist dargestellt als die durch die Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte (\pm SEM) im Verhältnis zu den Werten der Kontrolle. Der Wert der Kontrolle wurde als Referenz auf 100% festgelegt (gestrichelte Linie). **(B)** Für die Transfektion wurden jeweils 200 ng des Expressionsplasmids der Cofaktoren (Cof.) verwendet. Die Zellen wurden mit 0, 0,03, 0,3 und 3 nM Fludrokortison (Fludro.) für 24 h stimuliert. Die durch die Gaussia-Luciferase normalisierten Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase sind als MR-Aktivität in % (\pm SEM) dargestellt. Als Referenz (100%) wurde der Mittelwert der MR-Aktivität in Gegenwart von BAG-1M_mut bei 3 nM Fludrokortison verwendet. **(C-D)** Abgebildet sind repräsentative Westernblot-Experimente. Für die Analysen im Westernblot wurden je 15 μ l Probe auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Die Detektion der verschiedenen Proteine wurde mit Antikörpern gegen das Flag-Epitop (Cofaktor), das HA-Epitop (MR) und Aktin als Ladekontrolle durchgeführt.

HspBP1 führte bereits bei 50 ng Plasmid-DNA zu einer starken Reduktion der MR-Aktivität, die bei allen Plasmidmengen Hsc70/Hsp70-abhängig war (Abb. 25A). Im Falle des GR wurde die Hsc70/Hsp70-abhängige Inhibition dagegen erst bei drei-fach höheren HspBP1-Plasmidmengen beobachtet (Abb. 24A). HspBP1_mut hatte, vermutlich aufgrund der Restbindung von Hsc70/Hsp70, gegenüber der Kontrolle einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die MR-Funktion (Abb. 25A). Die MR-Aktivität schien in geringerem Maße davon betroffen zu sein als die GR-Aktivität (vgl. Abb. 25A mit Abb. 24A).

Der MR wurde im Vergleich zum GR durch BAG-1M, BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel kaum stimuliert, wenn 50 ng des Expressionsplasmids transfiziert wurden (Abb. 25A). Überraschenderweise zeigte BAG-1M mit zunehmenden Plasmidmengen einen starken inhibitorischen Effekt auf die MR-Aktivität. Obwohl BAG-1M_mut gegenüber der Kontrolle zu einer geringfügig schwächeren MR-Aktivität führte, wurde die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der Inhibition durch BAG-1M ab einer Plasmidmenge von 150 ng sichtbar (Abb. 25A). BAG-1M_Ubidel hatte, ähnlich wie beim GR, ab einer Menge von 100 ng Plasmid-DNA einen stark reduzierenden Einfluss auf die MR-Transaktivierung (Abb. 25A). Die Reduktion der MR-abhängigen Transkription war stärker als die Inhibition der *Firefly*-Aktivität (vgl. Abb. 23B und D).

In der Westernblot-Analyse zeigte sich der Anstieg der Proteinspiegel der Cofaktoren in Abhängigkeit der eingesetzten Plasmidmenge. Die MR-Expression wurde durch die Coexpression von HspBP1, HspBP1_Mut bzw. BAG-1M und BAG-1M_mut nicht verändert (Abb. 25C). Einzig BAG-1M_Ubidel, das eine geringfügig stärkere Expression als BAG-1M aufwies, führte bei hohen DNA-Mengen zu einer schwächeren MR-Expression. Ob dieser Unterschied in der MR-Expression für die deutlich schwächere MR-Aktivität in Gegenwart von BAG-1M_Ubidel verantwortlich ist, ist fraglich. Die Transfektion von 100 ng der Expressionsplasmide von BAG-1M- bzw. BAG-1M_Ubidel hatte keinen Einfluss auf die MR-Spiegel, trotzdem war der MR in Gegenwart von BAG-1M deutlich aktiver als in Gegenwart von BAG-1M_Ubidel (Abb. 25C).

Die Stärke des inhibitorischen Effekts der verschiedenen Cofaktoren war zudem von der Hormonkonzentration abhängig. Nach Stimulierung mit subsaturierenden Hormonkonzentrationen (0,03 nM) war die MR-Inhibition durch HspBP1, BAG-1M und BAG-1M_Ubidel am stärksten (Abb. 25B). Mit steigenden Flutrokortisonkonzentrationen nahm die MR-Aktivität wieder zu, erreichte jedoch nicht ihr Maximum, wie in Gegenwart von BAG-1M_mut oder HspBP1_mut. Die Coexpression beider Hsc70/Hsp70-Interaktions-Mutanten führte zu einer vergleichbaren MR-abhängigen Luciferase-Expression (Abb. 25B). BAG-1M_Ubidel führte auch in diesen Experimenten bei einer Flutrokortisonkonzentration von 0,03 nM zur stärksten Reduktion der MR-Funktion (Abb. 25B). Bei hohen Hormonkonzentrationen nahm der inhibitorische Einfluss von BAG-1M auf die MR-Aktivität ab (Abb. 25B).

In der Expressionskontrolle wurde kein Unterschied bezüglich der MR-Expression zwischen HspBP1 und HspBP1_Mut oder BAG-1M und den Mutanten BAG-1M_mut und BAG-1M_Ubidel festgestellt (Abb. 25D).

In diesen Experimenten wurde somit gezeigt, dass sowohl HspBP1 als auch BAG-1M mit steigender Proteinmenge und sinkender Hormonkonzentration zu einer Inhibition der MR-Aktivität führen. Der inhibitorische Effekt auf den MR war von Hsc70/Hsp70 abhängig. Die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der MR-Inhibition war in beiden Fällen sogar stärker als es für die Inhibition des GR beobachtet wurde. BAG-1M_Ubidel hatte den größten inhibitorischen Einfluss auf die transkriptionellen Aktivität des MR. Die Reduktion der MR-Aktivität durch BAG-1M_Ubidel war unabhängig von dem Einfluss auf die Luciferase-Aktivität und der Rezeptor-Expression.

c) Im Gegensatz zu BAG-1M inhibiert HspBP1 Hsc70/Hsp70-abhängig die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors

In diesem Abschnitt der funktionellen Analyse wurde der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Funktion des AR verglichen. Die Reporter-Experimente wurden wie unter 4.5.2b durchgeführt. Anstelle von Fludrokortison wurde der AR mit Dihydroxytestosteron (DHT) aktiviert. Für die Transfektion und Stimulierung der Zellen wurde Medium mit 10% steroidfreiem FBS verwendet.

Anders als in der Literatur beschrieben (Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003), führte BAG-1M in diesem Reporter-System zu einer Stimulierung der AR-Aktivität (Abb. 26A). Am stärksten war dieser Effekt mit einer Plasmidmenge von 100 ng BAG-1M zu beobachten. Mit steigender Menge Expressionsplasmid nahm dieser aktivierende Effekt ab. In Gegenwart von 200 ng BAG-1M Plasmid-DNA erreichte der AR eine vergleichbare Aktivität wie im Kontroll-Ansatz (Abb. 26A). BAG-1M_mut zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die AR-Aktivität (Abb. 26A). Demnach scheint der positive Effekt von BAG-1M von Hsc70/Hsp70 abhängig zu sein (Abb. 26A). BAG-1M_Ubidel stimulierte den AR sogar noch stärker als BAG-1M (Abb. 26A). Bei der geringsten DNA-Menge von 50 ng führte BAG-1M_Ubidel zu einer ca. 2,5-fach stärkeren transkriptionellen Aktivität als in der Kontrolle (Abb. 26A). Mit zunehmender Plasmidmenge nahm die AR-Aktivität ab und war bei 200 ng deutlich unter dem Wert der Kontrolle (Abb. 26A). Diese Reduktion der AR-Funktion entspricht jedoch in etwa dem erwarteten Effekt auf die *Firefly*-Luciferase-Aktivität (vgl. Abb. 23B und D) und kann daher nicht eindeutig als Inhibition der AR-Funktion gewertet werden.

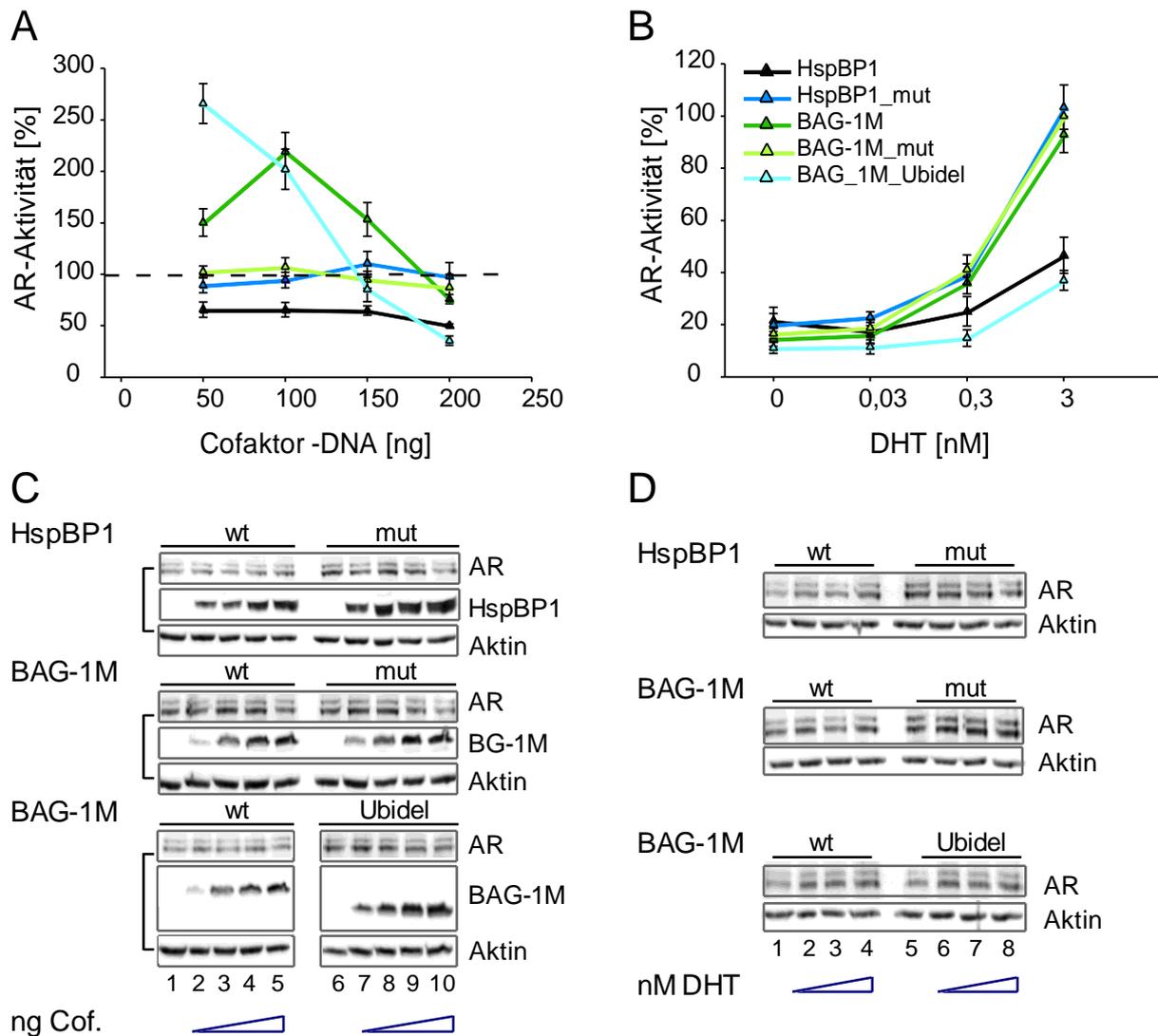


Abbildung 26: HspBP1 und BAG-1M haben, abhängig von ihrer Proteinmenge und der Hormonkonzentration, unterschiedliche Effekte auf die AR-Aktivität. Die Transfektion von 8000 Cos-7 Zellen wurde mit 60 ng MMTV-Luc Reporter-Plasmid, 5 ng Gaussia-Expressionsplasmid und 25 ng des Plasmids mit der kodierenden Sequenz für HA-AR durchgeführt. Für die Coexpression der Cofaktoren (Cof.) Flag-HspBP1, Flag-HspBP1_mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und Flag-BAG-1M_Ubidel bzw. pRK5-SV40-MCS (Kontrolle), wurden verschiedene Mengen der entsprechenden Expressionsplasmide cotransfiziert. Die Experimente wurden in Triplikaten und vier unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. **(A)** Es wurden jeweils 50, 100, 150 und 200 ng der Expressionsplasmide der Cofaktoren transfiziert. Die Zellen wurden für 24 h mit 3 nM DHT stimuliert. Die relative AR-Aktivität ist als Mittelwert der durch Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Aktivität (\pm SEM) dargestellt. Als Bezugspunkt von 100% wurde der Wert der Kontrolle verwendet. **(B)** Es wurde jeweils 200 ng der Plasmid-DNA für die Expression der Cofaktoren eingesetzt. Die relative AR-Aktivität ist als Mittelwert der durch die Gaussia-Aktivität normalisierten *Firefly*-Aktivität (\pm SEM) dargestellt. Der Mittelwert von BAG-1M_mut nach der Stimulierung mit 3 nM DHT wurde als Referenz auf 100% festgelegt. **(C-D)** Repräsentative Westernblot-Analysen. Es wurden jeweils 20 μ l Probe auf ein 12%iges PAA-Gel geladen und nach der Elektrophorese auf eine Membran transferiert. Die Proteindetektion wurde mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (AR), das Flag-Epitop (Cofaktoren) und Aktin als Ladekontrolle durchgeführt.

HspBP1 führte im Gegensatz zu BAG-1M unabhängig von der eingesetzten Plasmidmenge zu einer Inhibition der AR-Aktivität gegenüber der Kontrolle (Abb. 26A). Dieser inhibitorische Effekt erreichte sein Maximum bei 200 ng HspBP1 Plasmid-DNA. Da HspBP1_mut die AR-Aktivität in keiner Weise beeinflusste, schien der inhibitorische Effekt von HspBP1 durch Hsc70/Hsp70 vermittelt zu werden (Abb. 26A).

Die Westernblot-Analyse zeigte, dass die Proteinmenge der Cofaktoren mit der eingesetzten DNA-Menge korrelierte. Die Expression des AR wurde hierdurch kaum beeinflusst (Abb. 26C).

Die Effekte der Cofaktoren auf die AR-Aktivität schienen nicht von der Hormonkonzentration abhängig zu sein (Abb. 26B). Nach der Stimulierung mit 0,3 bzw. 3 nM DHT zeigte neben BAG-1M_Ubidel nur HspBP1 einen reduzierenden Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des AR (Abb. 26B). Der reprimierende Einfluss von BAG-1M_Ubidel ließ sich, wie bereits erwähnt, mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Inhibition der *Firefly*-Luciferase zurückführen. Wenn überhaupt, zeigte BAG-1M_Ubidel nur einen schwach inhibitorischen Effekt auf den AR (Abb. 26B). Einzig HspBP1 führte Hsc70/Hsp70-vermittelt zu einer Inhibition der AR-Aktivität. Die Expressionsanalyse des AR zeigte keine gravierenden Unterschiede in den AR-Spiegeln (Abb. 26D).

Zusammengefasst wurden in den funktionellen Analysen des GR, MR und AR Unterschiede bezüglich der Wirkungsweise von HspBP1 und BAG-1M festgestellt. Bereits in der Untersuchung der GR-Funktion zeigte sich dieser Unterschied. Mit geringen Mengen Plasmid-DNA zeigte BAG-1M stimulatorische Effekte auf den GR, HspBP1 hingegen hatte keinen Einfluss (Abb. 24A). Mit steigenden Plasmidmengen zeigten beide einen inhibitorischen Effekt auf die GR-Funktion. Der MR wurde überraschenderweise sowohl durch BAG-1M als auch durch HspBP1 inhibiert (Abb. 25). Der Effekt von HspBP1 war bereits in Anwesenheit geringer Plasmidmengen sichtbar. In beiden Fällen war die Wirkung auf GR und MR Hsc70/Hsp70-abhängig. Die Beobachtung, dass der inhibitorische Effekt von HspBP1 und BAG-1M in Abhängigkeit der Hormonkonzentration erfolgte, ließ die Annahme zu, dass beide NEF die Hormonbindungsaffinität von GR und MR reduzieren.

Die prominentesten Unterschiede in der Wirkungsweise der beiden Hsc70/Hsp70-NEF wurden jedoch in der funktionellen Analyse des AR festgestellt. Im Gegensatz zu BAG-1M, das den AR in geringen Mengen Hsc70/Hsp70-abhängig stimulierte, führte HspBP1 zu einer starken Reduktion der AR-Funktion, die ebenfalls über Hsc70/Hsp70 vermittelt wurde (Abb. 26A).

Den funktionellen Analysen zufolge wies HspBP1 auf den GR, MR und AR vergleichbare inhibitorische Effekte auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HspBP1 und BAG-1M die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Zusammensetzung der Chaperon-Substrat-Heterokomplexe untersucht. Als Substrat dienten die drei Steroidhormonrezeptoren GR, MR und AR.

4.2.6 Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die Komposition der Chaperon-Rezeptor-Heterokomplexe

Für die Funktion von SR ist die richtige Faltung essentiell. Hsc70/Hsp70 binden bereits während der Translation an die naszierenden Polypeptidketten und führen sie dem Faltungszyklus zu. Neben Hsc70/Hsp70 und Hsp90 sind Hsp40, Hop, Hip und p23 maßgeblich an der SR-Faltung beteiligt. HspBP1 und BAG-1M sollten zusammen mit GR bzw. MR oder AR überexprimiert und präzipitiert werden, mit den folgenden Zielen:

- 1) gibt es einen Unterschied in der Rezeptor-Bindung (Substratbindung) ?
- 2) welche faltungsrelevanten Cofaktoren können copräzipitiert werden, und lassen sich diesbezüglich Unterschiede feststellen?
- 3) kann dadurch auf die chronologische Reihenfolge geschlossen werden, wann HspBP1 bzw. BAG-1M ihren Einfluss auf Hsc70/Hsp70 ausüben?

Um Aussagen über die Spezifität und Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der Interaktionen treffen zu können, wurden HspBP1_mut und BAG-1M_mut in diese Untersuchung mit einbezogen.

Für die Interaktionsanalyse von den Cochaperonen HspBP1, BAG-1M sowie HspBP1_mut und BAG-1M_mut mit GR, MR und AR sowie ausgewählten faltungsrelevanten Cofaktoren wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. HEK 293 Zellen wurden mit gleichen Mengen der für Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut, Flag-HspBP1 und Flag-HspBP1_mut kodierenden Plasmid-DNA sowie pRK5-SV40-MCS als Kontrolle für die Spezifität der Rezeptor-Bindung, zusammen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden für HA-GR bzw. HA-MR oder HA-AR cotransfiziert. Drei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen lysiert und über Nacht mit anti-Flag-Agarose inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die spezifische Elution. Das präzipitierte Material wurde im Westernblot und durch Färbung der PAA-Gele mit kolloidal Coomassie analysiert. Für die Interaktionsanalysen wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die konstitutiv exprimierte Form Hsc70 erkennt. Die Stärke der Interaktionen mit HspBP1 und BAG-1M wurde quantitativ analysiert. Hierfür wurden die Intensitäten der im Westernblot bzw. Coomassie-Gel detektierten Proteinbanden densitometrisch bestimmt. Für die Quantifizierung der Rezeptor-Interaktion wurde zuerst die Intensität der copräzipitierten SR (CoIP) zur Intensität ihrer Expressionskontrolle (Lysat) ins Verhältnis gesetzt ($\frac{CoIP}{Lysat} = X$). Anschließend wurde der Quotient (X) auf die Intensität des präzipitierten HspBP1 bzw. BAG-1M (Flag-IP)

im Coomassie-Gel normalisiert ($\frac{X}{Flag-IP}$). Der letzte Schritt galt auch für die copräzipitierten endogenen Proteine. Die nachfolgenden drei Abbildungen (Abb. 27-29) zeigen jeweils repräsentative Westernblots der Interaktionsstudien von HspBP1 und BAG-1M sowie HspBP1_mut und BAG-1M_mut mit GR, MR und AR. Neben der Interaktion mit den Rezeptoren und Komponenten der Faltungsmaschinerie wurde auch die Bindung von Rpt6 und CHIP (E3-Ligase) untersucht, um gegebenenfalls für den Abbau relevante Aspekte mit einzubeziehen.

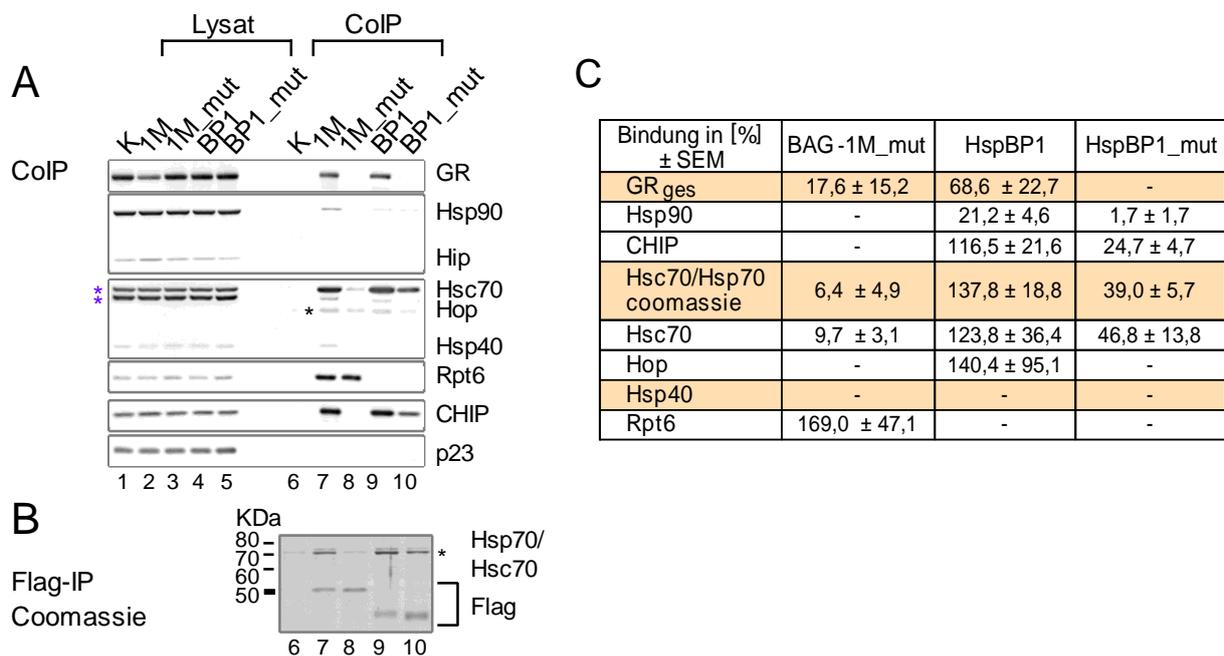


Abbildung 27: GR und Hsp40 binden bevorzugt an BAG-1M. HEK 293 Zellen wurden mit 8 µg der Expressionsplasmide für Flag-HspBP1 oder Flag-HspBP1_mut sowie Flag-BAG-1M und Flag-BAG-1M_mut und jeweils 2 µg der für HA-GR codierenden Plasmid-DNA cotransfiziert. Zur Kontrolle (K) der Spezifität der Rezeptor-Bindung wurde ein weiterer Ansatz mit gleichen DNA-Mengen HA-GR und pRK5-SV40 (Kontrolle) mitgeführt. Nach der Immunpräzipitation mit anti-Flag-Agarose und der Elution wurden jeweils 10 µg Zelllysat und 15 µl des präzipitierten Materials (CoIP) auf ein 12%iges PAA-Gel geladen und im Westernblot analysiert **(A)** Die endogenen Proteine wurden mittels Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte Hsc70, Hop, Hsp90, Hip, CHIP, Rpt6, und Hsp40 detektiert. Für die Detektion des GR wurde anti-HA-HRP verwendet. Der Stern neben Spur 6 markiert die Position der schweren Kette des anti-Flag-Antikörpers. Die beiden violetten Sterne außerhalb des Westernblot markieren die Position von Hsc70 (oben) und Hop (unten) **(B)** Coomassie-Gel (Flag-IP) der immunpräzipitierten Cochaperonen und des copräzipitierten Hsc70/Hsp70. Es wurden 0,8 µl Eluat auf ein 12%iges PAA-Gel geladen und mit kolloidal Coomassie gefärbt. Der Stern markiert Hsc70/Hsp70. **(C)** Quantitative Analyse der Bindung von GR, Hsc70/Hsp70 und Hsp40 (farbig unterlegt), Hsp90, CHIP, Hsc70, Hop und Rpt6 an HspBP1, HspBP1_mut, BAG-1M und BAG-1M_mut (± SEM). Die Mittelwerte für die Bindung an BAG-1M wurden als Referenz auf 100% festgelegt. Es wurden drei unabhängige Experimente quantitativ analysiert.

Der GR, Hsp90 und Hop interagierten sowohl mit BAG-1M als auch mit HspBP1 Hsc70-abhängig (Abb. 27A, vgl. die Spuren 7 und 9 mit den Spuren 8 und 10). Der Vergleich der GR-Expression zeigte, dass BAG-1M in diesen Experimenten einen schwachen negativen Einfluss auf die GR-Expression auszuüben schien (Abb. 27A, Spur 2).

Hsc70 und CHIP konnte im Gegensatz zu BAG-1M_mut mit HspBP1_mut copräzipitiert werden. Als Erklärung für diese Interaktionen könnte die Restbindung von Hsc70 an HspBP1_mut angeführt werden (Abb. 27A, Spur 10). Die E3-Ligase CHIP und Hsc70 interagierten ähnlich stark mit HspBP1 und BAG-1M (Abb. 27 die Spuren 7 und 9).

Hip, das Hsc70-interagierende Protein, konnte weder durch HspBP1 bzw. HspBP1_mut, noch durch BAG-1M bzw. BAG-1M_mut angereichert werden (Abb. 27A, die Spuren 7-8 und die Spuren 9-10).

Hsp40 und Rpt6 wurden ausschließlich mit BAG-1M copräzipitiert (Abb. 27A, die Spuren 7 und 8). Im Gegensatz zu Rpt6, das Hsc70-unabhängig mit BAG-1M interagiert, wurde die Bindung von Hsp40 über Hsc70 vermittelt (Abb. 27, vgl. Spur 7 mit Spur 8). In diesen Assoziationen unterschieden sich HspBP1 und BAG-1M.

Das Protein p23, ein Indikator für den spät im Zyklus gebildeten Hsp90-GR-Heterokomplex, wurde weder mit HspBP1 oder HspBP1_mut noch mit BAG-1M oder BAG-1M_mut angereichert (Abb. 27A). Es wurde nicht in die Quantifizierung mit einbezogen, da es hier als stellvertretendes Beispiel nur für den GR gezeigt wurde. Es ist jedoch anzunehmen, dass es nicht mit den Hsc70/Hsp70-NEF interagiert, bzw. nicht mit diesen im Komplex vorliegt. Diese Interaktion diene als Bestätigung, dass HspBP1 und BAG-1M an frühen SR-Faltungsstadien beteiligt sind.

Für die quantitative Analyse der Interaktionen mit HspBP1 und BAG-1M wurde die an BAG-1M gebundene Menge der entsprechenden Proteine jeweils als Referenz auf 100% festgelegt. Die Quantifizierung ergab, dass der GR etwas stärker mit BAG-1M interagiert als mit HspBP1 (Abb. 27C). Das Gleiche galt für Hsp90 (Abb. 27C). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Hsp90 über die Bindung an den GR copräzipitiert wurde. Hsp40 hat, wie bereits erwähnt nur an BAG-1M gebunden (Abb. 27C). Die Analyse des Coomassie-Gels (Abb. 27B) zeigte deutlich, dass HspBP1_mut über eine viel stärkere Restbindung an das Chaperon verfügt als BAG-1M_mut (Abb. 27B und C). Dies bestätigte sich durch die quantitative Analyse von Hsc70 im Westernblot (Abb. 27C). Die Restbindung von Hsc70 führte wiederum zu der vergleichsweise schwachen Bindung von CHIP an HspBP1_mut (Abb. 27A und C). Rpt6 wurde durch BAG-1M_mut stärker copräzipitiert als durch Wildtyp BAG-1M (Abb. 27C). Dieser Unterschied war in diesem Beispiel-Blot nicht eindeutig sichtbar, ergab sich aber durch die Quantifizierung der Rpt6-Bindung aus drei unabhängigen Experimenten und wurde bereits unter 4.2.3 beschrieben. Hip wurde weder mit HspBP1 noch mit BAG-1M copräzipitiert und konnte daher nicht quantitativ analysiert werden. Für die Interaktions-Analyse von Hop lieferten die drei Experimente widersprüchliche Ergebnisse

(vgl. Abb. 27C, SEM), daher wurde angenommen, dass es über Hsc70 vermittelt, ähnlich stark an HspBP1 und BAG-1M bindet.

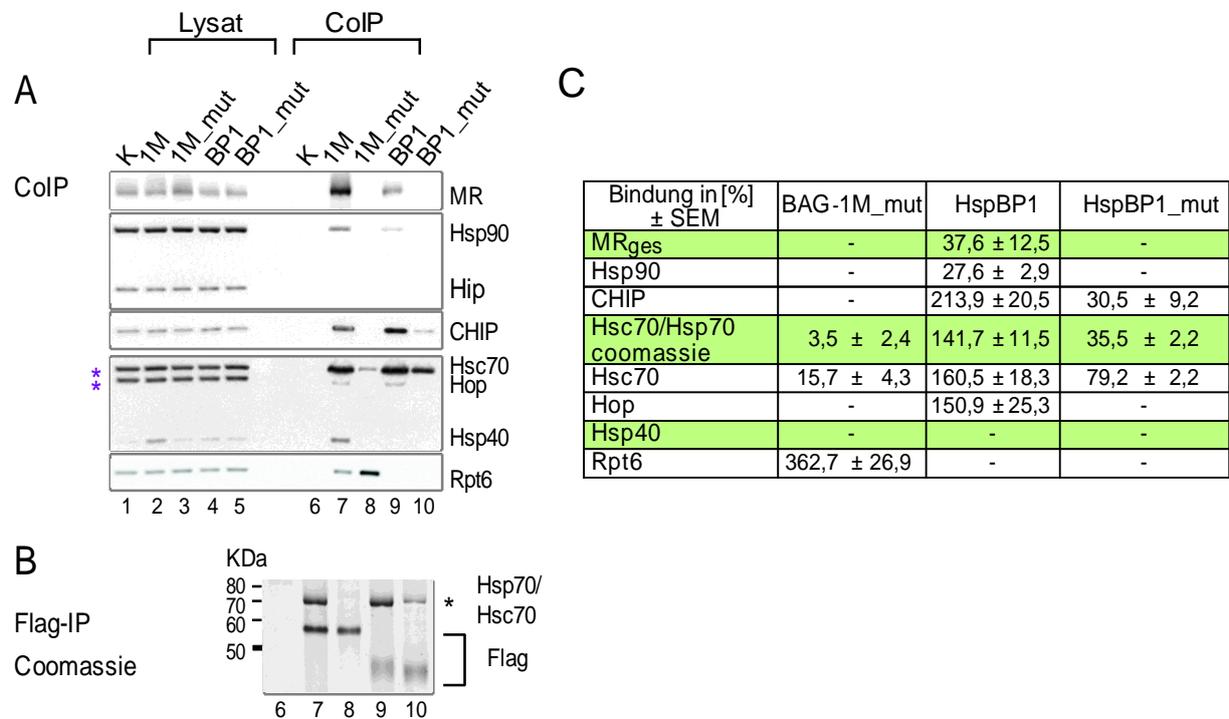


Abbildung 28: MR und Hsp40 binden bevorzugt an BAG-1M. Für die Transfektion von HEK 293 Zellen wurden jeweils 8 µg des Expressionsplasmids von Flag-HspBP1 oder Flag-HspBP1_mut sowie Flag-BAG-1M oder Flag-BAG-1M_mut und jeweils 2 µg der für HA-MR kodierenden Plasmid-DNA verwendet. Die Spezifität der Rezeptor-Bindung wurde in einem weiteren Transfektionsansatz mit gleichen DNA-Mengen HA-MR und pRK5-SV40 (Kontrolle, K) überprüft. Nach der Elution der mit anti-Flag-Agarose präzipitierten Proteine wurden jeweils 10 µg Zelllysate und 15 µl des präzipitierten Materials (CoIP) auf ein 12%iges PAA-Gel geladen und im Westernblot analysiert **(A)** Die endogenen Proteine Hsc70, Hop, Hsp90, Hip, CHIP, Rpt6, und Hsp40 wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Für die Detektion von BAG-1M und HspBP1 wurde anti-Flag-HRP, für den MR anti-HA-HRP verwendet. Die beiden violetten Sterne außerhalb des Westernblots markieren die Position von Hsc70 (oben) und Hop (unten) **(B)** Die immunpräzipitierten Cofaktoren und copräzipitiertes Hsc70/Hsp70 wurden mittels kolloidal Coomassie-Färbung detektiert (Flag-IP). Für die Detektion im Coomassie-Gel wurden 1,6 µl präzipitiertes Material auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Der Stern markiert die Position von Hsc70/Hsp70. **(C)** Quantifizierung der Bindung von MR, Hsc70/Hsp70 und Hsp40 (farbig hinterlegt), Hsp90, CHIP, Hsc70, Hop und Rpt6 an HspBP1, HspBP1_mut, BAG-1M und BAG-1M_mut (± SEM). Als Bezugswert wurde der Mittelwert der jeweiligen Bindungen an BAG-1M auf 100% festgelegt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Bindungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die Bindungsanalysen mit MR (Abb. 28) und AR (Abb. 29) ergaben ein sehr ähnliches Bild. Beide Rezeptoren interagierten Hsc70-abhängig deutlich stärker mit BAG-1M (Abb. 28 und 29, A und C, vgl. die Spur 7 mit der Spur 9). Für den AR wurden im Westernblot zwei Banden detektiert, die beide quantitativ analysiert wurden (l und k). Die lange Isoform (l) band am schwächsten an HspBP1 (Abb. 29C, und 29A vgl. die Spur 9 mit

der Spur 7). Hsp90 konnte in Gegenwart beider Rezeptoren mit BAG-1M und schwächer mit HspBP1 copräzipitiert werden (Abb. 28 und 29, C und A, vgl. die Spur 7 mit der Spur 9). Die hier deutlich schwächere Rezeptor- und Hsp90-Bindung an HspBP1 würde wieder dafür sprechen, dass Hsp90 über die Bindung an den MR und AR mit HspBP1 interagiert.

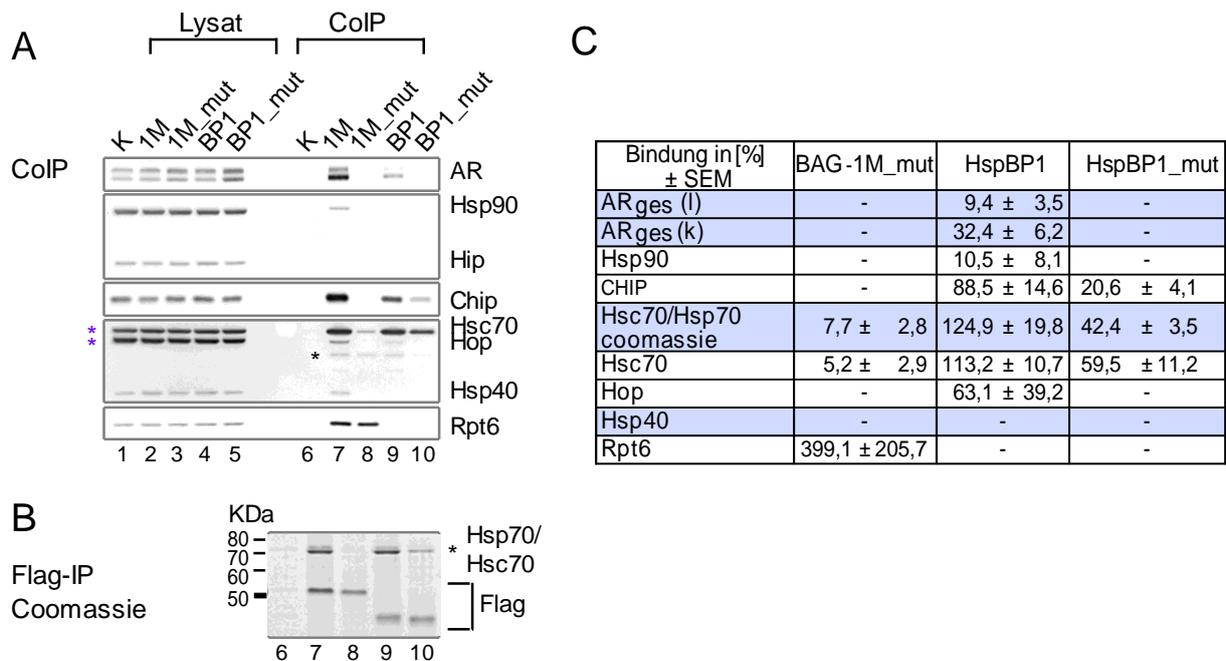


Abbildung 29: AR und Hsp40 binden beide bevorzugt an BAG-1M. Die Cotransfektion von HEK 293 Zellen erfolgte in getrennten Ansätzen mit 8 µg der Expressionsplasmide von Flag-HspBP1, Flag-HspBP1 _mut, Flag-BAG-1M, Flag-BAG-1M_mut und jeweils 2 µg der für HA-AR kodierenden Plasmid-DNA. Als Kontrolle (K) der Spezifität der Rezeptor-Bindung wurden in einem zusätzlichen Ansatz das HA-AR exprimierende Plasmid sowie der Expressionvektor pRK5-SV40-MCS cotransfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-Flag-Agarose über Nacht mit anschließender Elution. Für die Westernblot-Analyse wurden jeweils 10 µg Zelllysate als Expressionskontrolle und 15 µl Eluat auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. **(A)** Für die Detektion der endogenen Proteine Hsc70, Hop, Hsp90, Hip, CHIP, Rpt6, und Hsp40 wurden in der Westernblot-Analyse die entsprechenden Antikörper verwendet. Die Detektion des AR wurde mit anti-HA-HRP durchgeführt. Stern in Spur 6 kennzeichnet die Position der schweren Kette der anti-Flag Antikörper. Die Positionen von Hsc70 (oben) und Hop (unten) sind durch die violetten Sterne außerhalb des Westernblots gekennzeichnet **(B)** Mit kolloidal Coomassie gefärbtes PAA-Gel. Zu sehen sind die immunpräzipitierten Cochaperone und copräzipitiertes Hsc70/Hsp70 (Flag-IP). Es wurden 0,8 µl präzipitiertes Material auf ein 12%iges PAA-Gel geladen. Die Position von Hsc70/Hsp70 ist durch einen Stern markiert. **(C)** Densitometrische und quantitative Analyse der Bindung des AR, von Hsc70/Hsp70 und Hsp40 (farbig hervorgehoben) sowie von Hsp90, CHIP, Hsc70, Hop und Rpt6 an HspBP1, HspBP1_mut, BAG-1M und BAG-1M_mut (± SEM). Als Referenz der quantitativen Mengen wurden die Mittelwerte für die jeweilige Bindung an BAG-1M auf 100% festgelegt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und quantitativ analysiert.

Hsc70, CHIP, Hop und Hip wiesen ein sehr ähnliches Interaktionsmuster auf wie bereits für den GR beschrieben (vgl. Abb. 27 mit Abb. 28 und 29). Die Restbindung von Hsc70 an HspBP1_{mut} führte zu einer vergleichsweise schwachen Bindung von CHIP (Abb. 28 und 29, C und A, vgl. die Spur 10 mit Spur 9).

Hsp40 interagiert auch in Anwesenheit des MR bzw. AR in Abhängigkeit von Hsc70 nur mit BAG-1M (Abb. 28 und 29., C und A, die Spur 7). Die Bindung von Rpt6 an BAG-1M_{mut} war in Anwesenheit beider Rezeptoren stärker als die Bindung an BAG-1M (Abb. 28 und 29, C und A, vgl. Die Spur 8 mit der Spur 7).

Zusammenfassend konnten aus diesen Experimenten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Beide Hsc70/Hsp70-NEF griffen wie erwartet in frühe Stadien der SR-Faltung ein, da p23, eine essentielle Komponente für späte Hsp90-Rezeptor-Heterokomplexe, nicht copräzipitiert wurde. Der GR, MR und auch AR haben bevorzugt an BAG-1M gebunden. Da Hsp40 mit BAG-1M copräzipitiert wurde, nicht aber mit HspBP1, scheint HspBP1 einen Schritt früher als BAG-1M die Chaperon-Aktivität von Hsc70 zu modulieren. Die Befunde der Hsp40-Interaktion mit HspBP1 unterstützen Literaturangaben, die einen negativen Einfluss von HspBP1 auf die Hsp40-abhängige Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 beschreiben (Raynes & Guerriero, Jr., 1998). Die Ergebnisse der Interaktionsstudie zusammen mit den Daten der funktionellen Analyse ließen die Schlussfolgerung zu, dass sich HspBP1 und BAG-1M in ihrem grundlegenden Mechanismus bezüglich des Zeitpunktes ihres Einflusses auf die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 unterscheiden. Zusätzlich wiesen die Ergebnisse der funktionellen Untersuchung der Rezeptor-Aktivitäten darauf hin, dass HspBP1 und BAG-1M die Hormonbindungsaffinität von GR und MR reduzieren, wie es bei Fehlfaltungen geschehen kann. Im Falle des AR würde dies vermutlich nur für HspBP1 zutreffen.

Dies führte zu der Überlegung, ob der Einfluss von HspBP1 auf Hsc70/Hsp70-abhängige Prozesse, wie z.B. der Faltung von SR, messbar ist. Im Hinblick auf den Vergleich mit BAG-1M stellte sich die Frage, ob sich die Unterschiede in der Hsp40-Interaktion auf den Prozess selbst und vielleicht sogar in dessen zeitlichem Verlauf bemerkbar machen würden. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Einfluss von BAG-1M und HspBP1 auf die Faltung des GR und auf die Kinetik der Faltungsreaktion untersucht.

4.2.7 Etablierung eines zeitabhängigen Hormonbindungsexperiments in Gegenwart von BAG-1M und HspBP1

Im Folgenden wurde einerseits untersucht, ob sich der aufgrund der Bindungsanalysen zu vermutende zeitliche Unterschied auch in der Kinetik der Rezeptor-Faltung widerspiegelte, zum anderen ob HspBP1 Einfluss auf die Hormonbindungsaffinität des GR nahm. Als Methode, um Effekte auf die Faltung von SR zu untersuchen, wird im Allgemeinen der Einfluss auf die Hormonbindung betrachtet. Da der Einfluss von BAG-1M auf die Hormonbindungsaffinität des GR bekannt ist (Kanelakis *et al.*, 1999), sollte HspBP1 diesbezüglich mit BAG-1M verglichen werden.

Für diese Experimente wurde der „PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay Kit (Far Red“) von Invitrogen verwendet. Als Ligand wird ein selektiver GR Agonist verwendet, der an ein Fluorochrom mit einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 610 bzw. 670 nm gekoppelt wurde. Dieses sogenannte Fluoromon wird in subsaturierender, aber, im Gegensatz zu den herkömmlichen Hormonbindungsexperimenten, in konstanter Konzentration eingesetzt. Werden die Moleküle mit polarisiertem Licht angeregt, emittieren sie wiederum polarisiertes Licht, das mit den entsprechenden Filtern gemessen werden kann. Freies Fluoromon in Lösung depolarisiert das polarisierte Licht und somit wird eine niedrigere Polarisation gemessen. Nach Zugabe von GR-Molekülen, die in der Lage sind, das Fluoromon zu binden, wird eine höhere Polarisation bei 670 nm gemessen, da das Fluoromon immobilisiert wurde.

Die Messung des emittierten Lichtes erfolgt einmal parallel und einmal senkrecht zum eingestrahlt Licht. Für die Berechnung der Polarisation ([mP]) wurde folgende Formel verwendet:

$$mP = \frac{\text{parallel} - \text{senkrecht}}{\text{parallel} + \text{senkrecht}} * 1000$$

Die Hormonbindung wurde in Extrakten von HEK 293 Zellen gemessen, die nur GR oder GR zusammen mit BAG-1M, BAG-1M_mut oder HspBP1 überexprimierten. Um zu testen, wie effizient die Hormonbindung im Extrakt funktionierte und ob diese spezifisch war, wurden drei Kontrollen mitgeführt. Erstens wurde die Plasmid-DNA des GR zusammen mit dem Expressionsvektor pRk5-SV40-MCS cotransfiziert. Es wurde die Bindung des Fluoromons an den GR gemessen. Zweitens wurde in einer zweiten Messreihe im selben Ansatz die Bindung des Fluoromons durch den 1000-fachen Überschuss an nicht markiertem Dexamethason (selektiver GR Agonist) kompetiert. Drittens wurde in einem weiteren Kontrollansatz die Fluoromon-Bindung im Extrakt untransfizierter HEK 293 Zellen gemessen. Der letzte Ansatz gab Auskunft über die Bindung an zelluläre Komponenten (Hintergrundbindung). Drei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen lysiert und differentiell zentrifugiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Zellextrakte auf die gleiche Konzentration an Gesamt-Protein eingestellt und die

Ligandenbindung bei zunehmender Menge Zellextrakt gemessen. Der Zellextrakt wurde seriell (1:3) in dem Kit-eigenen Puffer (Assay-Puffer) verdünnt und mit 4 nM Fluoromon (in Assay-Puffer) versetzt. Die Kinetik des sich einstellenden Gleichgewichtes der GR-Ligandenbindung wurde über drei Stunden in konstanten zeitlichen Abständen gemessen. Die Messung der Hormonbindung erfolgte auf zwei Arten:

- a) über die Zeit, bei konstanter Proteinmenge (GR-Menge)
- b) über verschiedene Lysatmengen bei konstanter Zeit

Zuerst wurde der Einfluss von BAG-1M auf die Kinetik der Hormonbindung des GR in Abhängigkeit von Hsc70/Hsp70 in drei unabhängigen Experimenten untersucht. HEK 293 Zellen wurden entweder nur mit dem HA-GR Expressionsplasmid und einem Expressionsvektor als Kontrolle oder zusammen mit der Plasmid-DNA von Flag-BAG-1M bzw. Flag-BAG-1M_mut transfiziert.

Die Ergebnisse eines Experiments der Hormonbindung durch den GR in Gegenwart von BAG-1M sind in Abbildung 30 dargestellt. Abgebildet sind die verschiedenen Messpunkte innerhalb der einzelnen Konditionen. Die Höhe des Plateaus gibt Aufschluss über die Menge an hormonbindungsfähigem GR im Gleichgewicht. Die Zeit, die benötigt wird, bis sich das Bindungsgleichgewicht einstellt, kann anhand der X-Achse (Zeit) abgelesen werden und ist von der GR-Menge abhängig. Der Startpunkt der Bindungsreaktion korreliert ebenso mit der Rezeptormenge und sollte idealerweise innerhalb derselben Messpunkte der verschiedenen Konditionen (A-C) gleich sein. Er spiegelt damit die Menge freien Rezeptors wieder.

In den Bindungsreaktionen des GR (Abb. 30A) konnte gut beobachtet werden, dass sowohl die Höhe des Plateaus als auch der Reaktions-Startpunkt von der eingesetzten Proteinmenge (GR-Menge) abhängig waren. Beides sank mit abnehmender Lysatmenge. Das gleiche galt auch für die Zeit bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts. Je weniger GR vorhanden war, desto langsamer wurde das Bindungsgleichgewicht erreicht. In den Ansätzen mit BAG-1M und BAG-1M_mut wurde ähnliches beobachtet (Abb. 30B und C). In den beiden Kontroll-Ansätzen zeigte sich, dass keine GR-abhängige Bindungsreaktion stattfand. Es war zwar Rest-Bindung vorhanden, diese erreichte aber kein konstantes Bindungsgleichgewicht. Die spezifische Bindung durch den GR konnte mit dem 1000-fachen Überschuss an Dexamethason kompetiert werden (Abb. 30D). Die Bindung, die im „Leer“-Extrakt beobachtet wurde, ist auf die Hintergrundbindung zellulärer Komponenten, zurückzuführen (Abb. 30E). Ein Vergleich der Plateau-Höhe der Kompetition und des „Leer“-Extraktes deutete jedoch darauf hin, dass durch Dexamethason nicht nur die GR-spezifische, sondern auch die zelluläre Hintergrundbindung inhibiert werden konnte (Abb. 30, vgl. D und E). Erst ein Vergleich der verschiedenen Konditionen, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, gab Aufschluss darüber, ob BAG_1M einen Einfluss auf die Kinetik der Hormonbindung durch den GR hatte.

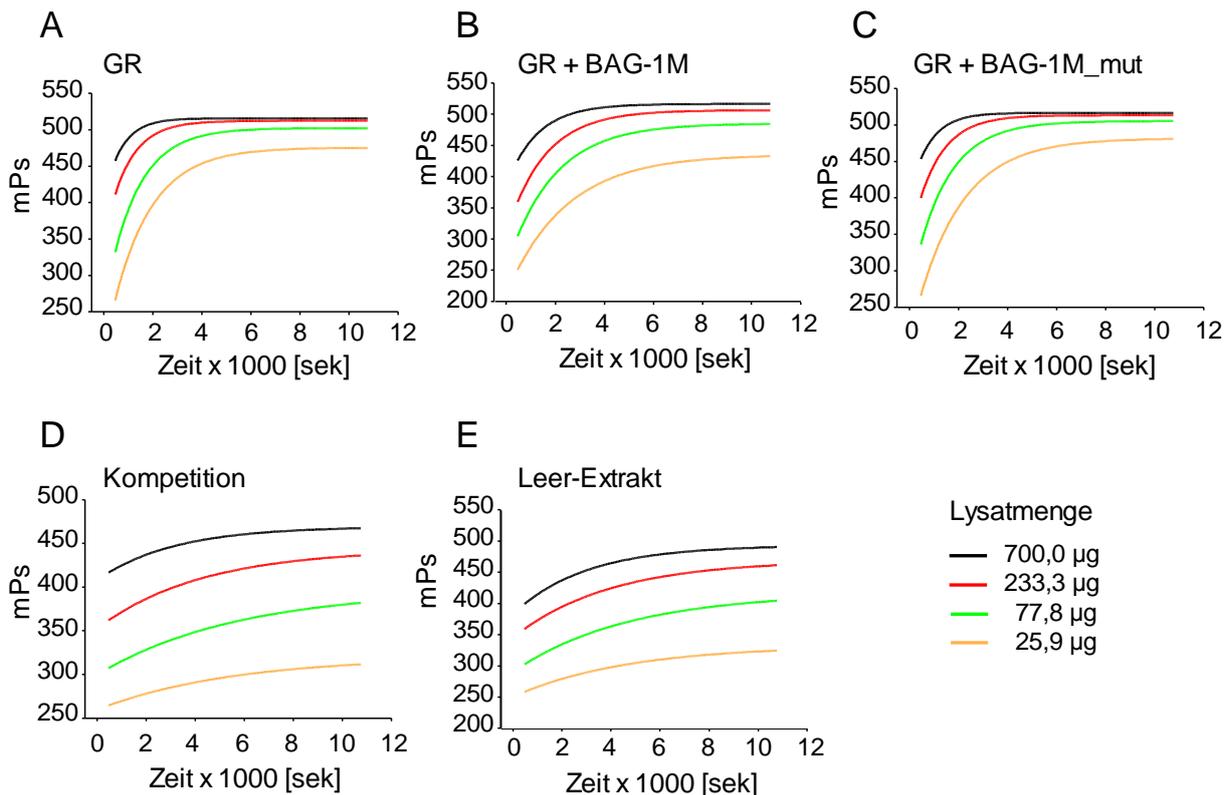


Abbildung 30: Hormonbindungskurve des GR in Zellextrakt in Abhängigkeit von Zeit und Proteinmenge. HEK 293 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von HA-GR (3,5 µg) entweder zusammen mit einem Leervektor (pRK5-SV40-MCS), oder der Plasmid-DNA von Flag-BAG-1M bzw. Flag-BAG-1M_mut (jeweils 6,5 µg) transfiziert. Die Hormonbindung wurde mit 4 nM Fluoromon im Extrakt in verschiedenen Messpunkten über 3 h gemessen. **(A)** Hormonbindung des GR. **(B)** Hormonbindung des GR in Anwesenheit von BAG-1M. **(C)** Hormonbindung des GR in Gegenwart von BAG-1M_mut. **(D)** Kompetition der Hormonbindung mit 1000-fachem Überschuss Dexamethason. **(E)** Hormonbindung im Extrakt untransfizierter Zellen („Leer“-Extrakt). Dargestellt ist die gemessene Polarisation [mPs] eines repräsentativen Einzelexperimentes. Die Ausgleichskurven wurden mit SigmaPlot nach folgender Formel berechnet: $y=y_0+a(1-e^{-bx})$.

a) BAG-1M führt zu geringerer Hormonaffinität des GR

Um den Einfluss von BAG-1M auf die Hormonbindungsfähigkeit festzustellen, wurde die Bindung zuerst nicht in Abhängigkeit der Zeit, sondern in Abhängigkeit der GR-Menge (µg Lysat) betrachtet. Anhand dieser Darstellung wurden die L_{50} -Werte der verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen (Abb. 31A). Anschließend wurde der Einfluss von BAG-1M auf die Bindungskinetik genauer untersucht (Abb. 31B-E).

Die Berechnung der Proteinmenge, bei der die halbmaximale Hormonbindung (L_{50}) erreicht wurde, ergab für BAG-1M einen doppelt so hohen L_{50} -Wert verglichen mit der Kontroll-Reaktion oder in Gegenwart von BAG-1M_mut (Abb. 31A). Dies bedeutete, dass in Anwesenheit von BAG-1M mehr Rezeptor notwendig war, um die gleiche Menge Hormon zu

binden wie ohne BAG-1M bzw. mit BAG-1M_mut. Grafisch zeigte sich die reduzierte Hormonbindungsaffinität durch eine Rechtsverschiebung der Kurve (Abb. 31A). In beiden Negativ-Kontrollen fand Hormonbindung statt, jedoch wurde deutlich mehr Extrakt benötigt, um die halbmaximale Hormonbindung zu erreichen. In dieser Darstellung zeigte sich deutlicher, dass durch Dexamethason nicht nur die GR-abhängige Bindung, sondern auch die Hintergrundbindung kompetiert wurde.

Die Hsc70/Hsp70-abhängige Reduktion der Hormonbindungsaffinität des GR durch BAG-1M wurde auch sichtbar, wenn man die Bindung in unterschiedlichen Messpunkten in Abhängigkeit der Zeit verglich (Abb. 31 B-E).

Bei maximaler Lysatmenge wurde das Gleichgewichtsplateau in Anwesenheit von BAG-1M zwar erreicht (Abb. 31B), mit abnehmender Proteinmenge jedoch stellte sich das Bindungsgleichgewicht auf einem niedrigeren Niveau ein (Abb. 31C-E). Wie bereits erwähnt, ist die Höhe des Plateaus von der Proteinmenge bzw. von der Menge an ligandenbindungsfähigem GR abhängig. Da BAG-1M die Ligandenaffinität des GR herabsetzte, war unter der gegebenen Hormonkonzentration weniger Rezeptor bindungsfähig und somit mehr GR nötig, um dieselbe Menge Hormon unter den gleichen Bedingungen wie in der Kontrolle binden zu können.

Das Gleiche galt auch für die zeitliche Komponente. BAG-1M führte zu einer geringeren Menge bindungsfähigen Rezeptors, deshalb verzögerte sich die Einstellung des Bindungsgleichgewichts (Abb. 31B und Abb. 31 A-E). BAG-1M hatte dadurch einen Einfluss auf die Kinetik der Hormonbindung des GR.

Bei näherer Betrachtung der Reaktions-Startpunkte fiel jedoch auf, dass in den Ansätzen mit BAG-1M bereits vor Beginn der Bindungsreaktion deutlich weniger GR vorhanden gewesen zu sein schien.

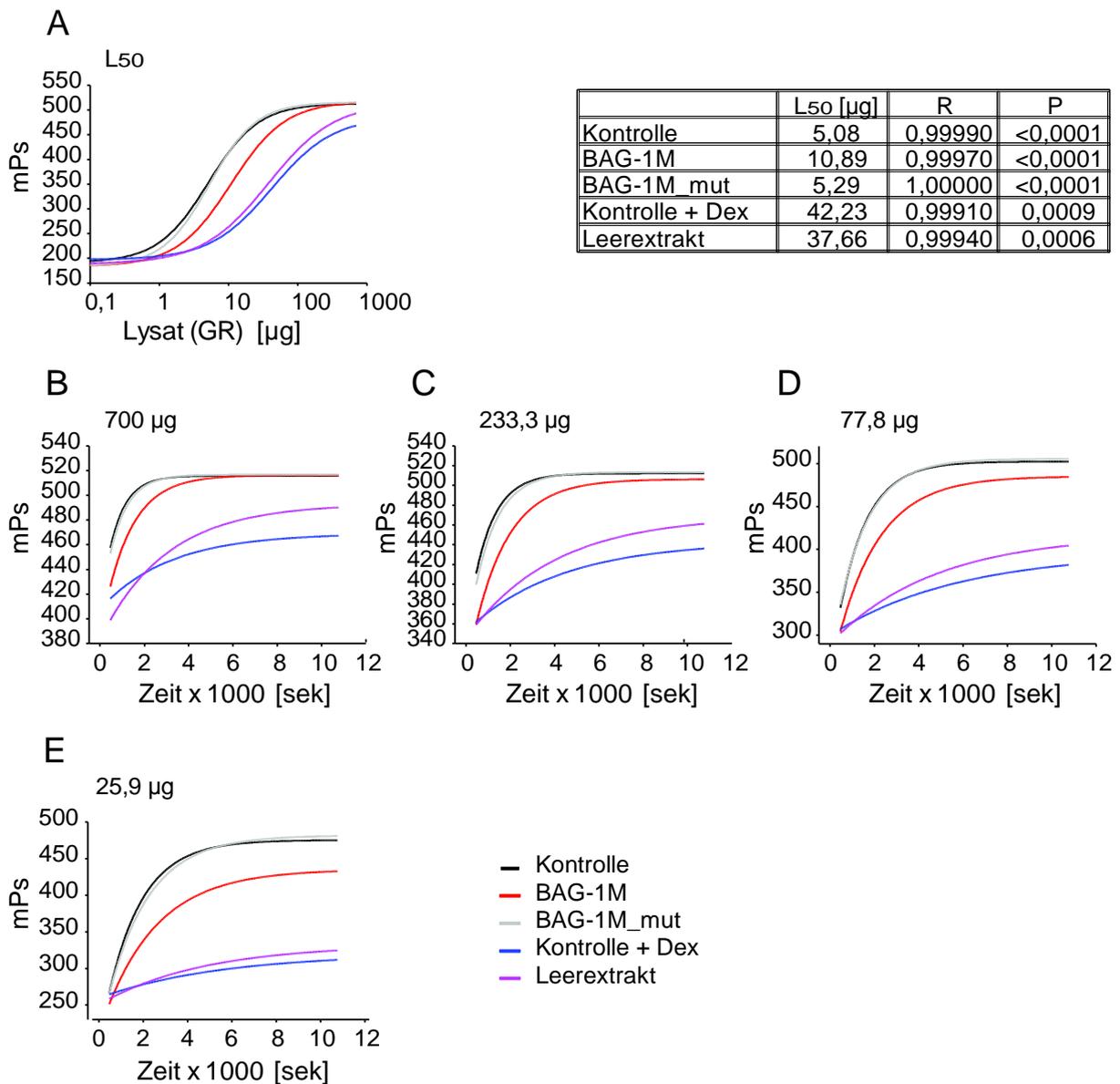


Abbildung 31: BAG-1M reduziert die Hormonbindungsaffinität des GR. (A) Polarisation in Abhängigkeit von der Lysatmenge (GR-Menge). Der L_{50} -Wert gibt die Lysatmenge [µg] an, bei der die halbmaximale Hormonbindung erreicht wird. Berechnung des L_{50} des in Abb. 30 gezeigten Experiments (Sigma Plot). Der Korrelationskoeffizient (R), die P-Werte sowie der L_{50} -Wert der Hormonbindung der verschiedenen Bedingungen sind in der Tabelle rechts zusammengefasst. **(B-E)** Vergleich der Hormonbindungsreaktion der einzelnen Konditionen für vier verschiedene Messpunkte in Abhängigkeit der Zeit (700 µg Lysat (B), 233,3 µg Lysat (C), 77,8 µg Lysat (D) und 25,9 µg Lysat (E)). Die Kontrolle entspricht dem Reaktionsansatz, in dem nur HA-GR überexprimiert wurde (vgl. Abb. 30A).

b) BAG-1M reduziert die Proteinmenge des GR

Um diese Beobachtung besser interpretieren zu können, wurden die Bindungsreaktionen mit und ohne (Kontrolle) BAG-1M noch einmal im selben Diagramm in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen (Abb. 32A).

Der direkte Vergleich der Bindungsreaktion für vier verschiedene Messpunkte zeigte, dass die GR-Menge in den Ansätzen mit BAG-1M etwa einem Drittel der GR-Menge in den Kontrollen entsprach (Abb. 32A). So verlief z.B. die Bindungsreaktion in 233,3 µg Kontroll-Lysat ähnlich wie die Hormonbindung in 700 µg BAG-1M-Lysat. Die Start-Punkte dieser Bindungskurven lagen in etwa auf gleicher Höhe. Der zeitliche Verlauf bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts in den Ansätzen mit BAG-1M ähnelte dem Verlauf der Kontrollextrakt-Experimente, die ein Drittel der Proteinmenge enthielten (Abb. 32A). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die GR-Expression mittels Westernblot-Analyse kontrolliert (Abb. 32B und C). Für die quantitative Analyse der Westernblots wurden die Intensitäten (I) der Proteinbande des GR und Aktin densitometrisch bestimmt ($\frac{I(GR)}{I(A)}$). Es zeigte sich, dass BAG-1M zu einer starken Reduktion der GR-Menge führte (Abb. 32 B und C). Die verbleibende und somit potentiell bindungsfähige Menge GR entsprach ca. 40-60% der GR-Menge im Kontrollextrakt. Das Bindungsverhalten des GR über die Zeit in Anwesenheit von BAG-1M entsprach etwa dem Bindungsverhalten des GR in einem Drittel der Extraktmenge ohne coexprimiertes BAG-1M. Da ohne weitere Analysen nicht klar war, ob ein Drittel des Kontrollextraktes und der Extrakt mit BAG-1M vergleichbare Mengen an bindungsfähigem GR enthielten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass BAG-1M die Hormonbindungsaffinität des GR reduziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BAG-1M in unserem System in erster Linie die GR-Menge negativ beeinflusste. Aus diesem Grund schienen die beobachteten Effekte von BAG-1M auf die Kinetik der Hormonbindung sowie auch auf die Hormonaffinität des GR im Wesentlichen auf die reduzierten GR-Spiegel zurückgeführt werden zu können.

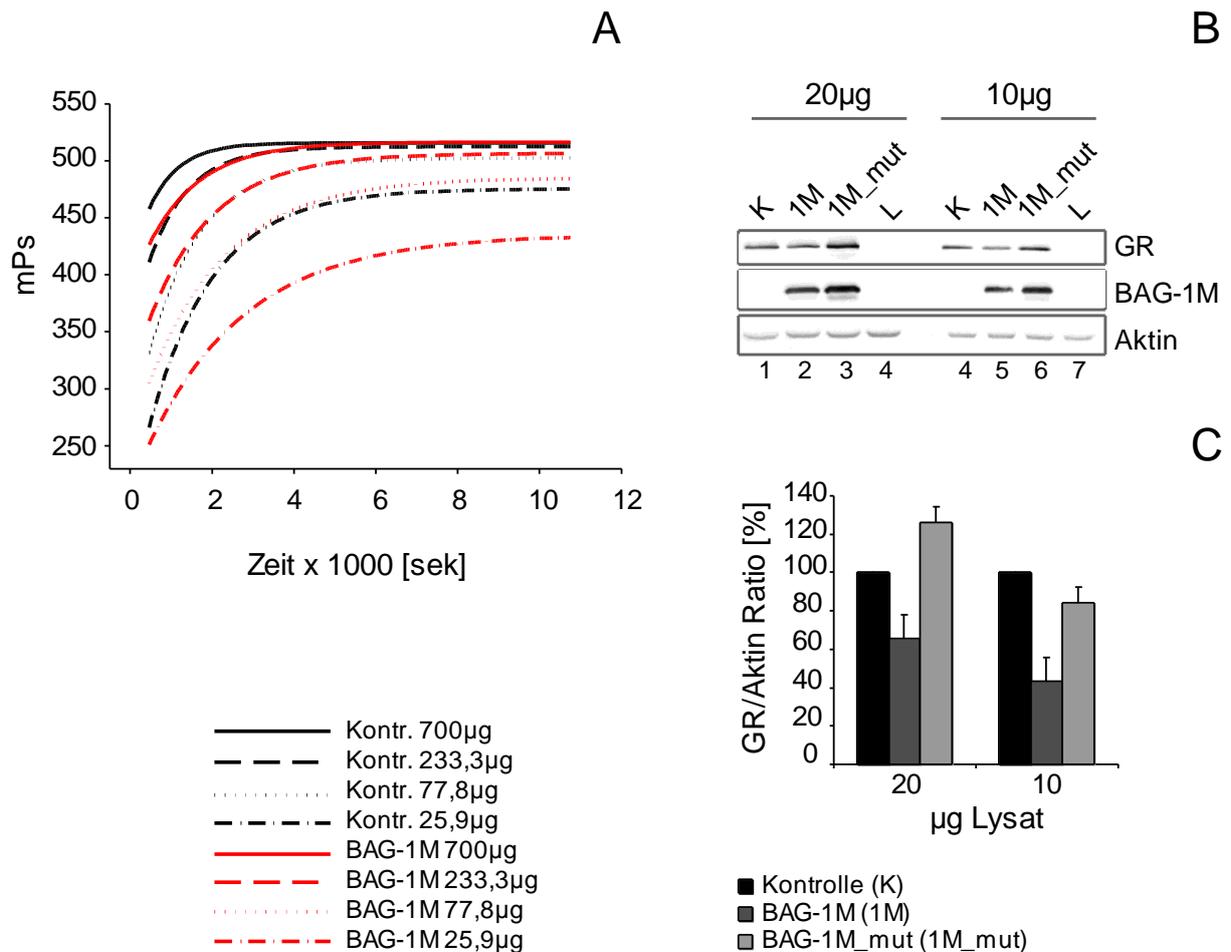


Abbildung 32: BAG-1M führt zu reduzierten GR-Spiegeln. (A) Hormonbindungskurven des Kontrolllextraktes und in Anwesenheit von BAG-1M für vier verschiedene Messpunkte in Abhängigkeit der Zeit. (B) Repräsentativer Westernblot eines Experiments. Geladen wurden jeweils 20 µg und 10 µg der Kontrolle, (K, Spur 1), BAG-1M (1M, Spur 2), BAG-1M_mut (1M_mut, Spur 3) und des „Leer“-Extraktes (L, Spur 4). Die Detektion der verschiedenen Proteine erfolgte mit anti-HA-HRP (GR), Flag-HRP (BAG-1M) und Aktin als Ladekontrolle. (C) Quantitative Analyse der GR-Expression aus drei unabhängigen Experimenten. Die Proteinbanden des GR und von Aktin wurden densitometrisch analysiert. Die GR-Expression wurde auf die Aktin-Expression normalisiert. Dargestellt ist das GR/Aktin Verhältnis in % (+SEM). Die GR-Menge der Kontrolle wurde jeweils mit 100% als Referenz festgelegt.

c) HspBP1 hat keinen Einfluss auf die exprimierte oder hormonbindungsfähige Menge an GR

Wie sich herausstellte, schien der Einfluss von BAG-1M auf die Bindungsaffinität des GR und die Kinetik der Hormonbindungsreaktion in einer Reduktion der GR-Spiegel begründet zu sein. Es war zwar bekannt, dass BAG-1M in Kooperation mit CHIP den proteasomalen Abbau des GR vermittelt (Demand *et al.*, 2001), jedoch wurde dies in den funktionellen Experimenten der SR-Aktivität bisher nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung war die unterschiedliche experimentelle Durchführung der funktionellen und der Hormonbindungsanalyse. Da für HspBP1 der gegenteilige Effekt auf den CHIP-induzierten Proteinabbau beschrieben wurde (Alberti *et al.*, 2004), wurde BAG-1M für den weiteren Vergleich mit HspBP1 in die nächste Versuchsreihe mit einbezogen. Ebenfalls mitgeführt wurde in den nachfolgenden Hormonbindungsstudien FKBP51. Das Immunophilin, das einen negativen Einfluss auf die Hormonbindungsaffinität des GR hat (Denny *et al.*, 2000), diente als Positivkontrolle für die Reduktion der Ligandenaffinität.

Für eine korrekte Interpretation der Hormonbindungsstudien ist insbesondere die Menge an bindungsfähigem GR ausschlaggebend. Dies galt im Besonderen für den in diesem Zusammenhang beobachteten Einfluss von BAG-1M. Die Reduktion der GR-Spiegel durch BAG-1M alleine ließ jedoch noch nicht die Annahme zu, dass die beobachtete Abnahme der Hormonaffinität des GR durch BAG-1M einzig auf dem Abbau der Rezeptormoleküle beruhte. Theoretisch konnte die verbleibende GR-Menge ausreichen, um dieselbe Anzahl Liganden-Moleküle zu binden wie in der Kontrolle. Da das Gleiche auch für HspBP1 und FKBP51 der Fall hätte sein können, wurde im Vorfeld der Kinetik-Messung die Menge an hormonbindungsfähigem GR in denselben Extrakten bestimmt. Für die Herstellung der Extrakte wurden HEK 293 Zellen verwendet, die entweder HA-GR oder HA-GR zusammen mit Flag-BAG-1M, Flag-HspBP1 oder FKBP51-Flag coexprimierten. Als Kontrolle für die GR-unabhängige Hintergrundbindung des Zellextraktes wurde ein zusätzlicher Ansatz Zellen ohne Plasmid-DNA elektroporiert.

Anstelle des Fluoromon wurde [³H]-Kortikosteron ([³H]-Kort) verwendet, das zur Bestimmung der Gesamt-Menge an bindungsfähigem GR in hoher Konzentration (300 nM [³H]-Kort) eingesetzt wurde. Nach der Bindungsreaktion wurde das ungebundene [³H]-Kort mit Hilfe eines Aktivkohle-Dextran-Gemisches von der gebundenen GR-[³H]-Kort-Fraktion abgetrennt. Anschließend erfolgte die Messung des gebundenen [³H]-Kort. Zusätzlich wurde mittels Westernblot-Analyse die GR-Expression in den einzelnen Ansätzen kontrolliert und quantifiziert. Beide Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

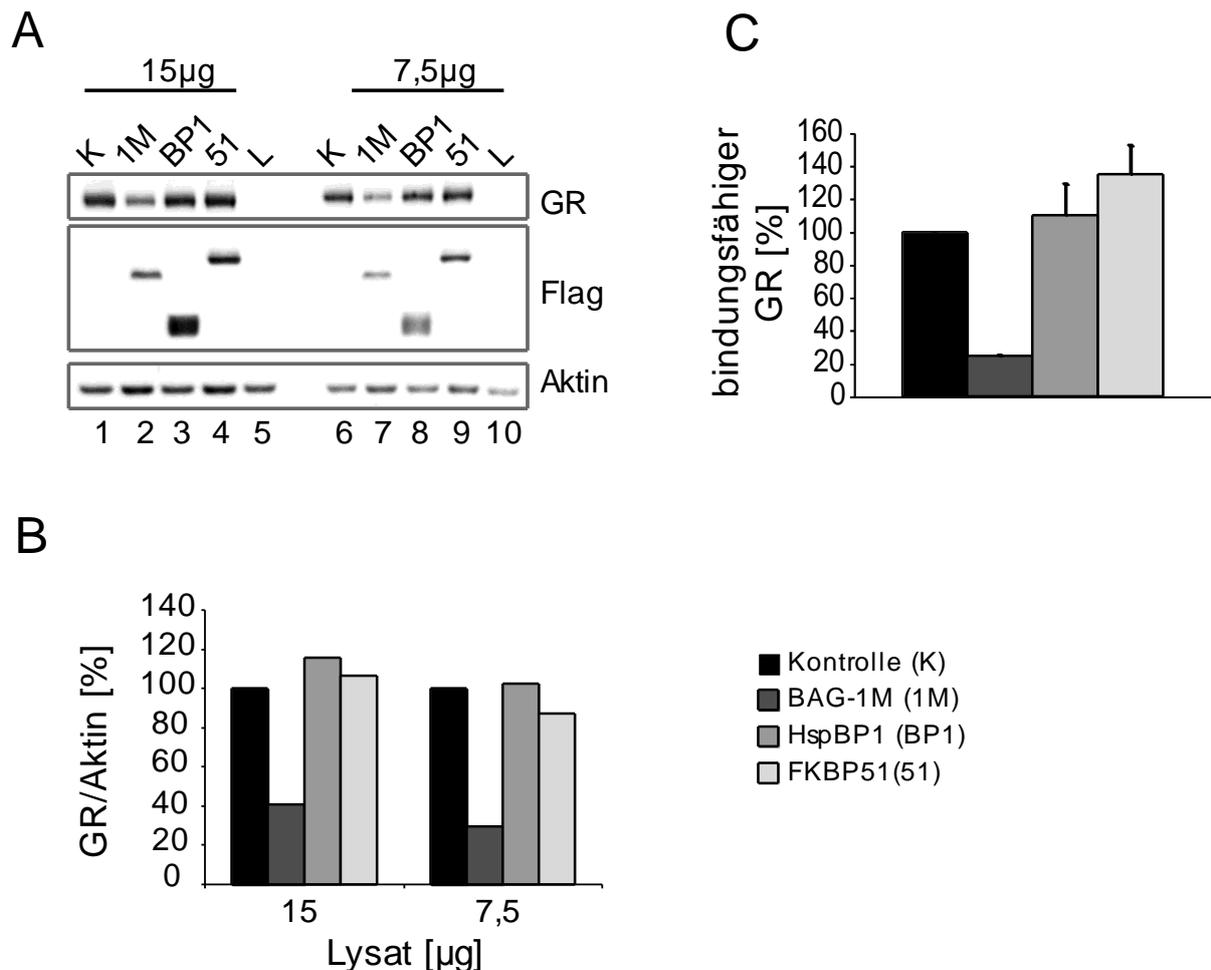


Abbildung 33: HspBP1 reduziert im Gegensatz zu BAG-1M weder die Gesamtmenge an GR, noch die Menge an bindungsfähigem GR. HEK 293 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von Flag-BAG-1M, bzw. Flag-HspBP1 oder FKBP51-Flag (6,5 µg) und jeweils 2 µg der Plasmid-DNA von HA-transfiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen nur mit 3,5 µg HA-GR-Plasmid und 6,5 µg Expressionsvektor (pRK5-SV40-MCS) elektroporiert. Für die Bestimmung der Hintergrundbindung wurden untransfizierte Zellen verwendet („Leer“-Extrakt). **(A)** Westernblot-Analyse der Extrakte für die Hormonbindungsstudie. Die Detektion des Rezeptors erfolgte mit anti-HA-HRP. BAG-1M (1M), HspBP1 (BP1) und FKBP51 (51) wurden mit anti-Flag-HRP visualisiert. Anti-Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Das „Leer“-Extrakt (L) wurde zusätzlich mit aufgetragen (Spur 5 und Spur 10). **(B)** Quantifizierung der GR/Aktin-Verhältnisse des Experiments aus A relativ zur Kontrolle (nur HA-GR). Die Rezeptormenge der Kontrolle wurde als Referenz auf 100% festgelegt. **(C)** Dargestellt ist die Menge an hormonbindungsfähigem GR in % relativ zur Kontrolle abzüglich der zelleigenen Hintergrundbindung. Die Hormonbindung wurde mit [³H]-Kort. in zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Bestimmung der Menge an ligandenbindungsfähigem GR wurde in Duplikaten in 480-500 µg Zellextrakt durchgeführt.

Die Quantifizierung der Westernblot-Analyse ergab, dass BAG-1M im Vergleich zur Kontrolle die exprimierte GR-Menge auf ca. 30-40 % reduzierte (Abb. 33B). Dies spiegelt sich auch in der Menge an hormonbindungsfähigem GR wider (Abb. 33C). Im Gegensatz zu BAG-1M zeigten weder HspBP1 noch FKBP51 einen Einfluss auf das Expressionsniveau des

GR (Abb. 33B). Beide Proteine hatten auch keinen nennenswerten Einfluss auf die Menge an ligandenbindungsfähigem GR (Abb. 33C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die beschriebene Reduktion der Hormonbindungsaffinität des GR durch BAG-1 wahrscheinlich auf die Reduktion des Expressionsniveaus bzw. der Rezeptorstabilität zurück geführt werden kann. HspBP1 und FKBP51 hingegen hatten keinen Einfluss auf die Expression und Hormonbindungsfähigkeit des GR. Im nächsten Schritt wurde die Hormonbindung des GR in Anwesenheit von BAG-1M, HspBP1 und FKBP51 verglichen.

d) HspBP1 hat keinen Einfluss auf die Hormonbindungsaffinität des GR, jedoch auf die Kinetik der Hormonbindungsreaktion

Nach der Bestimmung der Menge an ligandenbindungsfähigem GR in Anwesenheit von BAG-1M, HspBP1 und FKBP51 wurde im nächsten Schritt ihr Einfluss auf die Hormonbindung des GR verglichen. Dies diente vor allem dazu, einen Überblick über die Funktionalität und die Aussagekraft dieser Methode zu erhalten. Die Hormonbindungsanalyse fand unter den experimentellen Bedingungen wie unter 4.2.7 beschrieben statt.

Zuerst wurde untersucht, ob der von FKBP51 erwartete negative Effekt auf die Hormonbindungsaffinität des GR unter subsaturierenden Hormonbedingungen (4 nM Fluoromon) sichtbar war und inwieweit HspBP1 diese modulierte. Hierfür wurden die L_{50} -Werte in Anwesenheit der verschiedenen Cofaktoren mit der Kontrolle verglichen (Abb. 34). Der Vergleich der Proteinmengen, die zu einer halbmaximalen Ligandenbindung führen, zeigte geringe Unterschiede zwischen der Kontrolle, HspBP1 und FKBP51 (Abb. 34). In den Extrakten mit HspBP1 und FKBP51 lagen die L_{50} -Werte bei 11,79 nM bzw. 10,77 nM verglichen mit der Kontrolle (8,96 nM). Allerdings schien FKBP51 die Hormonbindungsfähigkeit in den Messpunkten mit höheren Proteinmengen sichtbar zu reduzieren. Die Hormonbindung in Gegenwart von FKBP51 erreichte nicht das Plateau der Kontrollreaktion. Unter diesen Bedingungen wäre mehr GR nötig gewesen, um die gleiche Menge Hormon zu binden wie es in der Kontrolle der Fall war.

Die Reduktion der exprimierten GR-Menge durch BAG-1M schlug sich in dieser Reaktion, wie erwartet, auch auf den L_{50} -Wert nieder (Abb. 34). Verglichen mit der Kontrolle war in Anwesenheit von BAG-1M mit einem L_{50} -Wert von 21,83 nM fast die drei-fache Menge an GR nötig, um unter gleichen Bedingungen dieselbe Menge Hormon zu binden (Abb. 34).

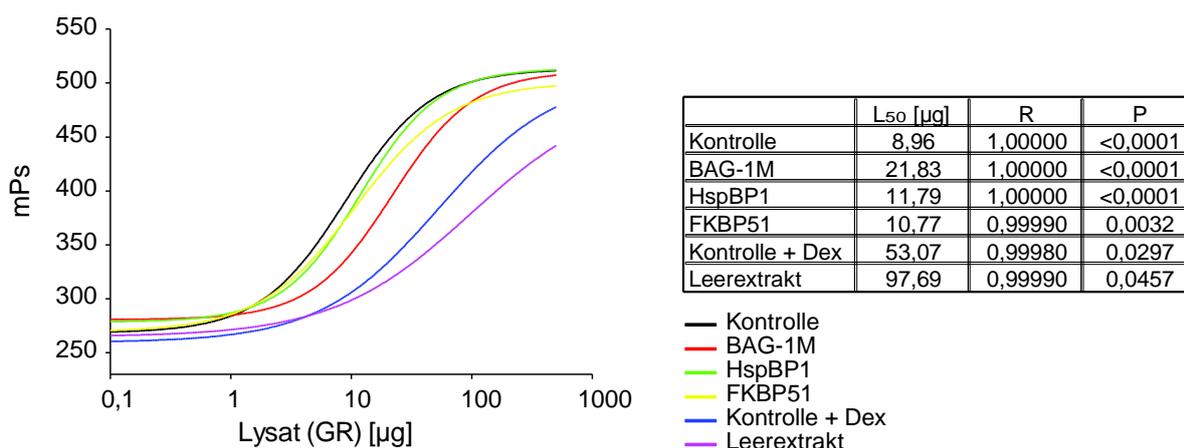


Abbildung 34: HspBP1 hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Hormonbindungsaffinität des GR. HEK 293 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid von HA-GR (3,5 µg) zusammen mit jeweils 6,5 µg der Plasmid-DNA von Flag-HspBP1, FKBP51-Flag, oder Flag-BAG-1M bzw. Leervektor (pRK4SV40-MCS) als Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurde ein Kompetitionsansatz (Kontrolle + Dex) und der Extrakt untransfizierter Zellen („Leer“-Extrakt) mitgeführt. Die Hormonbindung wurde in verschiedenen Extrakt-Mengen mit 4 nM Fluoromon untersucht. Dargestellt ist die Polarisation der verschiedenen Messpunkten in Abhängigkeit von der Lysatmenge (GR-Menge). Die L₅₀-Werte wurden mittels SigmaPlot berechnet. Der Korrelationskoeffizient (R), die P-Werte sowie der L₅₀-Wert der Hormonbindung der verschiedenen Bedingungen sind in der Tabelle rechts zusammengefasst. Die Messung erfolgte über 3 h in regelmäßigen zeitlichen Abständen. Die mathematische Anpassung der Bindungskurven wurde mit SigmaPlot nach folgender Formel durchgeführt:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + (x/EC50)^{-HillSlope}}$$

Nachdem festgestellt wurde, dass weder HspBP1 noch FKBP51 einen nennenswerten Effekt auf die Hormonbindungsaffinität des GR hatten, wurde als nächstes ihr Einfluss auf die Kinetik der Bindungsreaktion untersucht. Es galt die Frage zu beantworten, ob sich der Einfluss von HspBP1 auf die Hsp40-abhängige Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 auch im zeitlichen Verlauf der Hormonbindung bemerkbar macht. Darüber hinaus konnte am Beispiel von FKBP51 verglichen werden, wie sich ein Faktor, der die Hormonbindung des GR schwächt, auf die Kinetik der Hormonbindungsreaktion auswirkt. Die Ergebnisse der Hormonbindung des GR in Abhängigkeit der Zeit sind in Abbildung 35A-C dargestellt. Neben den mP-Werten wurde zusätzlich der Verlauf der Bindung anhand der Gesamtintensität [RFU] beobachtet (Abb. 35 D-E).

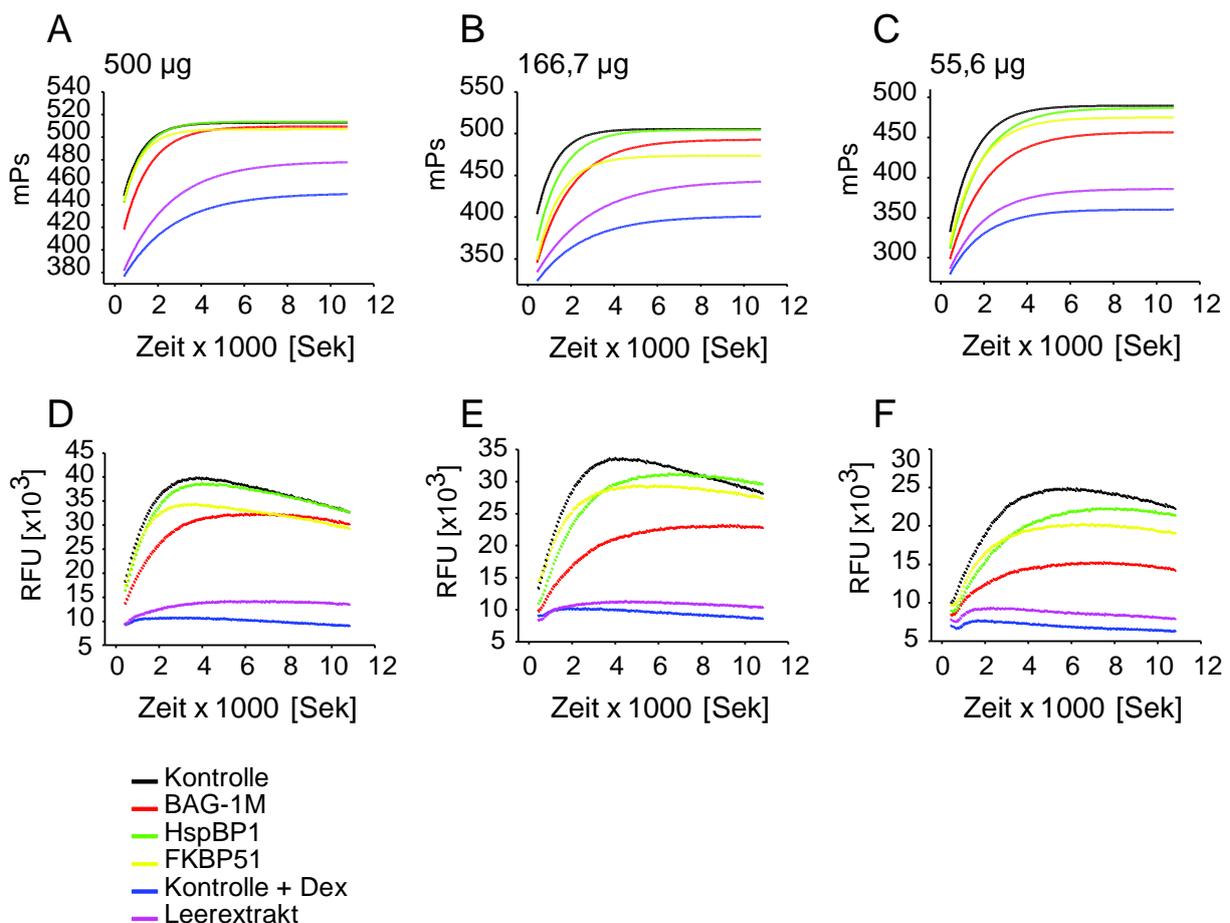


Abbildung 35. HspBP1 zeigt eine Tendenz die Kinetik der Hormonbindung des GR zu beeinflussen, FKBP51 reduziert die Hormonbindungs-Affinität des GR. (A-C) Vergleich der Hormonbindungsreaktionen von HspBP1, BAG-1M und FKBP51 innerhalb vier verschiedener Messpunkte. Die Ausgleichskurven der erhaltenen Bindungsreaktionen wurden mit SigmaPlot durchgeführt (vgl. Abb. 30). (D-E) Rohdaten der berechneten Gesamt-Intensität der Fluoreszenz [RFU] (*relative fluorescence units*) der entsprechenden Messdaten.

Im Gegensatz zu den mP-Werten, die ein gleichbleibendes Plateau erreichten, fielen die Werte der Gesamt-Intensität der Fluoreszenz im Kontrollansatz, nachdem sie ein Maximum erreicht hatten, wieder ab (Abb. 35 vgl. A-C mit D-F). Da sich die Intensitäten der parallel und senkrecht gemessenen Fluoreszenz ähnlich verhielten, war dieser Effekt zwar in der Gesamt-Intensität der Fluoreszenz zu sehen, nicht aber in den Polarisationsdaten.

In Anwesenheit von BAG-1M stellte sich das Gleichgewicht der Hormonbindung später ein und erreichte nicht die Höhe der Kontrolle (Abb. 35A-C). Dies war zu erwarten, da in Gegenwart von BAG-1M weniger GR vorhanden war (vgl. Abb. 33). Der Unterschied in der Bindungsreaktion zwischen Kontrolle und mit BAG-1M wurde in der Darstellung der RFU noch deutlicher sichtbar (Abb. 35 D-F).

Der Einfluss von HspBP1 auf die Hormonbindung des GR war in der Darstellung der Gesamt-Intensität der Fluoreszenz wesentlich stärker sichtbar, als es die Werte der Polarisation (mP) widerspiegeln (Abb. 35, vgl. A-C mit D-F). HspBP1 zeigte einen Effekt auf die zeitliche Komponente dieser Reaktion, der am stärksten in den Ansätzen mit 166,7 und 55,6 µg Lysat beobachtet wurde (Abb. 35 E und F). Mit abnehmender Lysat- und daher GR-Menge, wurde in Anwesenheit von HspBP1, verglichen mit der Kontrolle, ein deutlicher Effekt auf die Kinetik der Hormonbindungsreaktion sichtbar. Das Bindungsgleichgewicht stellte sich später ein, erreichte jedoch ein vergleichbares Plateau wie in der Kontrollreaktion (Abb. 35D-F).

Auch der Einfluss von FKBP51 auf die Ligandenbindungsaffinität des GR war in der Darstellung der Fluoreszenz-Intensität am eindrucklichsten zu sehen. Es konnte ein Unterschied in der Plateauhöhe beobachtet werden, die ein Maß für die Menge an hormonbindungsfähigem GR darstellt. Am offensichtlichsten war dies in dem Messpunkt mit 166,7 µg Protein zu beobachten (Abb. 35B und E). Das Plateau der Reaktion mit FKBP51 befand sich unterhalb der Kontrolle und unterhalb von HspBP1. Somit zeigte FKBP51 in den zeitabhängigen Bindungsreaktionen einen stärkeren reduzierenden Einfluss auf die Ligandenaffinität des GR als es der berechnete L_{50} -Wert hatte vermuten lassen (vgl. Abb. 34). Eine Reduktion der Menge an bindungsfähigem GR hatte natürlich auch einen Einfluss auf die Kinetik der Reaktion, was sich auch im Kurvenverlauf der Reaktion, sowohl in der Polarisation, als auch in der Gesamt-Intensität der Fluoreszenz, widerspiegelte (Abb. 35A-C und D-E).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BAG-1M in unserem System in erster Linie die GR-Menge beeinflusst, und nicht, wie beschrieben (Kanelakis *et al.*, 1999), die Ligandenaffinität. Die beobachteten Effekte auf die Kinetik der Hormonbindung durch den GR wie auch auf die Hormon-Affinität wurden hier in diesen Experimenten auf die reduzierten GR-Spiegel zurückgeführt. HspBP1 zeigte, im Gegensatz zu BAG-1M, einen Effekt auf die Kinetik der Hormonbindungsreaktion im Polarisationsexperiment. Es hatte keinen Einfluss auf die exprimierte oder bindungsfähige Menge GR. Der beschriebene negative Einfluss von FKBP51 auf die Hormonbindungs-Affinität des GR (Denny *et al.*, 2000), nicht deutlich in den berechneten L_{50} -Werten, wurde erst im Zeit-abhängigen Polarisationsexperiment eindeutig nachweisbar. Da kein Einfluss auf die Expression des GR oder auf die Menge an bindungsfähigem GR in Anwesenheit von 300 nM [3 H]-Kort festgestellt wurde, konnte der bekannte Effekt von FKBP51 mit dieser Methode betätigt werden. Die Ergebnisse bezüglich des Einflusses von FKBP51 unterstützen somit zumindest teilweise die Eignung dieser Methode. In Anbetracht der Tatsache, dass BAG-1M einen Einfluss auf die GR-Expression zeigte, sollte stets eine Analyse der maximalen Bindungskapazität des Rezeptors zusätzlich durchgeführt werden.

Als Fazit des Vergleichs von HspBP1 und BAG-1M wurde gefolgert, dass sich der beschriebene mechanistische Unterschied der beiden NEF auf Hsc70/Hsp70 (Shomura et al, 2005) ebenfalls in einer unterschiedlichen Wirkung auf die Signaltransduktion von SR widerspiegelt. Durch funktionelle Analysen der Rezeptor-Aktivität und Interaktionsstudien wurde am Beispiel von GR, MR und AR gezeigt, dass sich der zugrunde liegende Mechanismus von HspBP1 und BAG-1M bezüglich ihres Effekts auf Hsc70/Hsp70-Klienten unterscheidet. Darüber hinaus ließen die Ergebnisse der Hormonbindungsanalyse des GR vermuten, dass sich ein Einfluss von HspBP1 auf frühe Aktionen von Hsc70/Hsp70, nämlich die durch Hsp40 getriebene ATP-Hydrolyse durch Hsc70/Hsp70, auch im zeitlichen Verlauf der von Hsc70/Hsp70-vermittelten Faltungsprozessen bemerkbar macht.

4.3 Design eines murinen Mineralokortikoidrezeptors mit der Hormonaffinität des Glukokortikoidrezeptors

4.3.1 Zwei Strategien: mMR-GR-LBD Chimäre und Punktmutationen in der MR-LBD

Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass die Balance zwischen Glukokortikoid (GR)- und Mineralokortikoidrezeptor (MR)-Aktivität in bestimmten Hirnregionen wichtig für die neuronale Aktivität, die körpereigene Stressantwort und das Verhalten ist. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zum Beispiel zu einer Veränderung der Stressantwort führen, gefolgt von der Entwicklung psychopathologischer Veränderungen. Chronischer Stress kann zum Beispiel dieses MR/GR-Gleichgewicht stören. Durch den erhöhten Spiegel des Stresshormons Kortisol ist der GR über einen längeren Zeitraum aktiv als unter stressfreien Bedingungen. Dies kann Veränderung in der HPA-Achsen-Regulation zur Folge haben, wie sie in vielen Patienten mit depressiver Störung beobachtet wird. Aufgrund der höheren Affinität für Kortisol ist der MR sowohl unter basalen als auch unter Stress-Bedingungen gleichermaßen aktiv, da er immer mit dem Liganden besetzt ist. Die Relevanz dieser MR/GR-Balance-Hypothese soll in einem transgenen Mausmodell untersucht werden, das ektopisch in bestimmten Hirnregionen einen MR mit der Kortikosteron-Affinität des GR exprimiert. Unter Stress soll das Kortisol-Signal (Kortikosteron in der Maus) auf diesen mutierten MR umgeleitet werden. Gemeinhin gilt, dass für die Ligandenaffinität die Faltung und somit die Struktur-gebenden Reste der Ligandenbindungsdomäne (LBD) verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Strategien angewandt, um einen mMR mit der Glukokortikoid-Affinität des mGR zu generieren (Abb. 36).

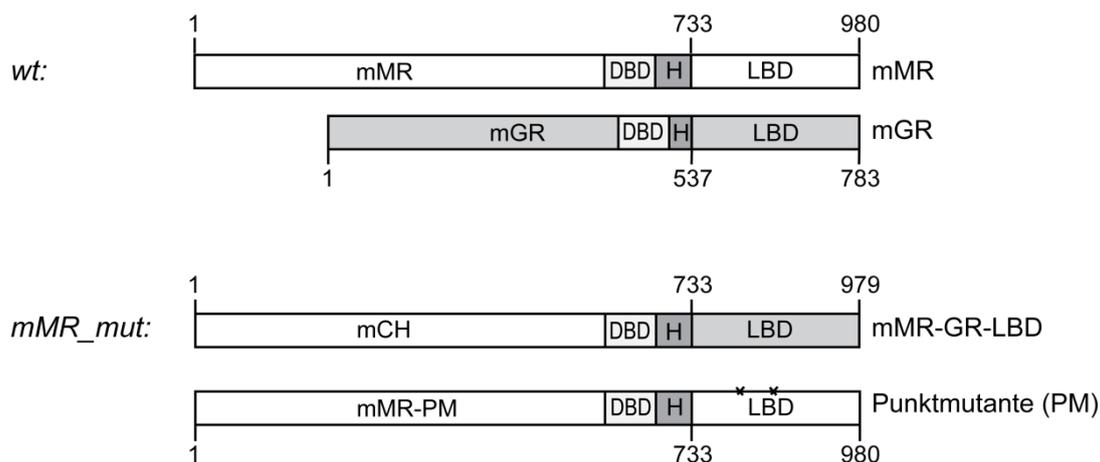


Abbildung 36: Schematische Darstellung der murinen Wildtyp-Rezeptoren (wt) und der mMR-Mutanten (mMR_mut). Das mMR-GR-LBD-Fusionsprotein (mCH) stellt eine Chimäre aus den N-terminalen Resten des mMR und der LBD des mGR dar. In der mMR-Punktmutante (mMR-PM) sind als Beispiel zwei Punktmutationen in der LBD markiert.

Zur Herstellung der transgenen Konstrukte wurde der murine Mineralokortikoidrezeptor (mMR) verwendet. Da zu diesem Zeitpunkt die cDNA des mMR nicht verfügbar war, wurde die codierende Region anhand einer vorhergesagten mRNA-Sequenz und der daraus resultierenden Proteinsequenz durch einen Sequenzvergleich der bekannten Proteinsequenzen des GR und MR aus Ratte, Maus und Mensch bestimmt. Die so erhaltene codierende Sequenz (CDS) diente als Vorlage für das Design der entsprechenden Klonierungsprimer. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus der murinen hippocampalen Zelllinie HT22 isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die CDS des mMR wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus dieser cDNA amplifiziert und in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert.

Im ersten Ansatz wurde die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des mMR durch die LBD des mGR ersetzt. Somit entstand eine mMR-GR-LBD Chimäre, ein Fusionsprotein aus mMR und mGR (im Weiteren mCH genannt). Der zweite Ansatz verfolgte die Herstellung einer mMR-Punktmutante (siehe Abb. 36).

Mit Hilfe der Kristallstruktur der humanen GR-LBD (Bledsoe *et al.*, 2002; pdb: 1M2Z) wurde ein Homologie-Modell der mMR-LBD erstellt (Swiss-Modell Server, www.expasy.ch/swissmod/SWISS.Model.html). Die Proteinsequenz der LBD des mMR wurde *in silico* in die Kristallstruktur des humanen MR-LBD (Bledsoe *et al.*, 2005; pdb: 2AA2) eingepasst und mit der Struktur des humanen GR (hGR) verglichen (Abb. 37).

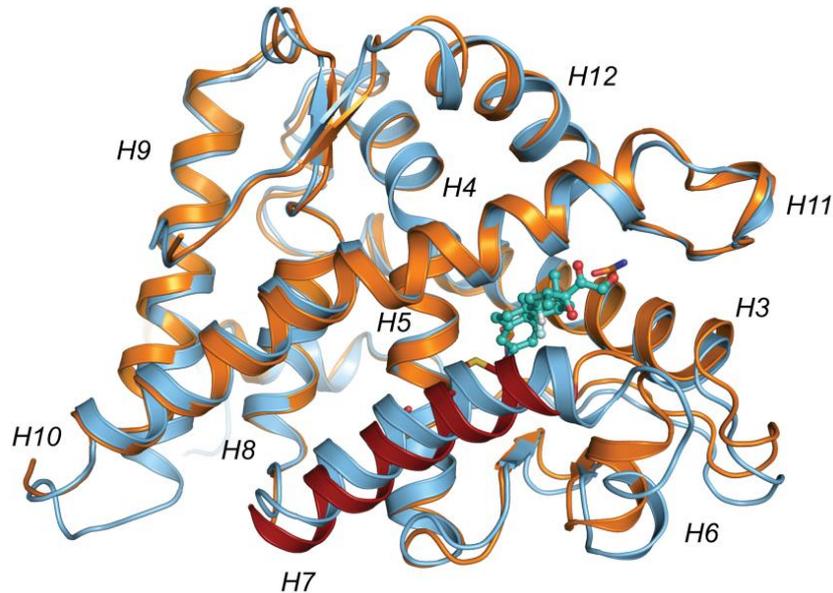


Abbildung 37: Überlagerung der Strukturen von hGR und der adaptierten LBD des mMR. Die Nomenklatur der Helices entspricht der des hMR anhand des Proteinsequenz-Alignments (siehe Anhang). Die mMR-Sequenz ist orange, die hGR-Sequenz hellblau dargestellt. Helix 7 (rot, mMR) und Helix 5 (hellblau, hGR) zeigen die stärkste Abweichung bzgl. ihrer strukturellen Ähnlichkeit. Als gebundener Ligand ist hier das synthetische Glukokortikoidcoid Dexamethason (aus pdb: 1M2Z) dargestellt.

Die Überlagerung der mMR-LBD mit der Ligandenbindungsdomäne des hGR verdeutlicht, wie gering die Unterschiede bezüglich der Faltung zwischen den Ligandenbindungsdomänen der beiden SR sind. Die stärksten strukturellen Abweichungen sind bei Helix 7 des mMR zu sehen. Verglichen mit der homologen Helix 5 des hGR ist H7 im mMR um etwa 2\AA verschoben (Abb. 37). Bei genauerer Betrachtung der bindingsrelevanten Helices der LBD zeigt sich, dass diese Verschiebung von H7 vermutlich auf eine veränderte Packung von Helix 5 und Helix 7 zurückzuführen ist (Abb. 38). Die Verschiebung von Helix 7 im Vergleich von hGR und mMR führt zu einer Veränderung der van-der-Waals-Kontakte mit den C- und D-Ringen im Steroidhormon (Ligand) und trägt somit zur Liganden-Spezifität und -Affinität bei. Diese Beobachtung diente als Ausgangspunkt für die Suche nach relevanten Resten in der mMR-LBD, deren Mutation eine GR-ähnlichen Affinität für das Stresshormon Kortikosteron schaffen. Dies sollte zum einen durch eine Verschiebung der Helix 7, zum anderen durch eine lokale „Korrektur“ der Bindungstasche geschehen.

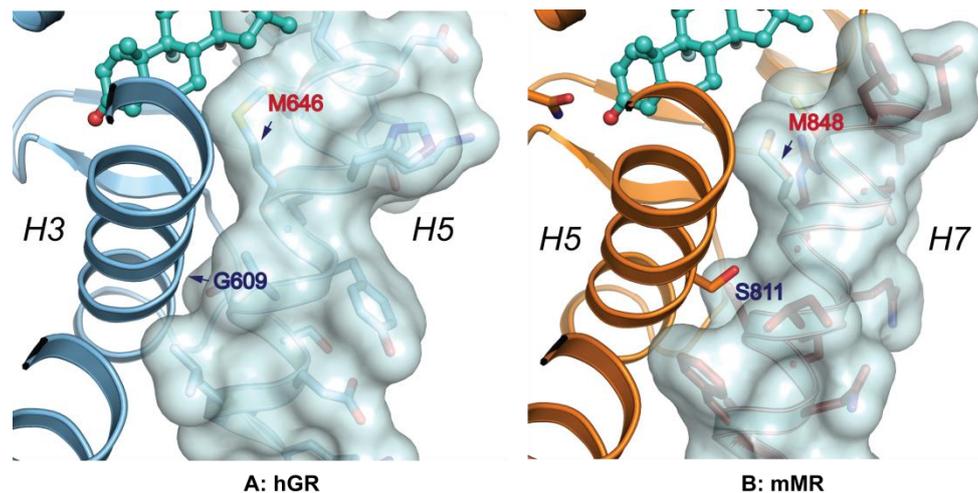


Abbildung 38: Orientierung der bindingsrelevanten Helices der Ligandenbindungsdomäne. (A) Moleküloberfläche von H5 und Packung an H3 im hGR. **(B)** Orientierung der beiden Helices H7 und H5 zu einander in der *in silico* konstruierten mMR-LBD. Die exponierten Aminosäuren im hGR (G609 und M646) liegen an derselben Stelle innerhalb der Struktur wie die hervorgehobenen Reste S811 und M848 im mMR. Durch die Mutation S811G wird Helix 7 im mMR (B) verschoben. Die Substitution M848I führt zu einer lokalen „Korrektur“ der Bindungstasche.

In der Struktur des hGR (Abb. 38A) ist an der Position, die dem Serin-Rest 811 des mMR (Abb. 38B) entspricht, ein Glycin eingebaut (G609). Hier liegt die Helix 3 (mMR: H5) näher an Helix 5 (mMR: H7). Die Substitution des Serins durch Glycin (S811G) würde H7 (Abb. 38B) in eine vergleichbare räumliche Position zu Helix 5 und zum Liganden schieben, wie sie in der LBD des hGR gegeben ist (Abb. 38A).

Ähnliches gilt für die Nähe zum Liganden. Die Distanz von H5 zum Liganden ist in der hGR-Struktur deutlich geringer als in der des mMR (H7), obwohl beide Rezeptoren an derselben strukturgebenden Position ein Methionin besitzen. Ein Austausch von Methionin zu Isoleucin (M848I) in Helix 7 des mMR führt zu einer lokalen Vergrößerung der Bindungstasche.

Die in Abbildung 39 dargestellte Übersicht der Liganden-Umgebung verdeutlicht noch einmal die beiden Strategien und zeigt die Verschiebung der α -Helix 7 zwischen mMR und hGR.

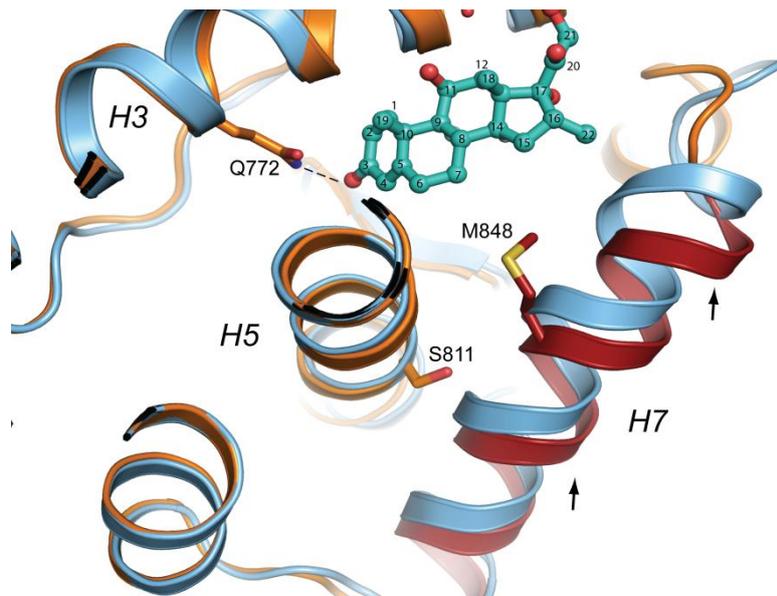


Abbildung 39: Verschiebung der α -Helix 7 zwischen mMR und hGR. Die Sequenz des mMR ist orange markiert, die des hGR hellblau. Die Nomenklatur der Helices beruht auf der des hMR ausgehend von dem Vergleich der Proteinsequenzen (siehe Anhang). Die Nummerierung der exponierten Aminosäure-Reste (Q772, S811 und M848) bezieht sich auf die Anzahl der Aminosäuren in der mMR-Sequenz. Der hier dargestellte gebundene Ligand ist Dexamethason. Der Rest Q772 in H3 interagiert durch eine H-Brücke mit dem Keton des 3. Kohlenstoffes (C3) in Dexamethason. Die Reste S811 und M848 in H5 und H7 des mMR verhindern sterisch die Annäherung der H7 an H5 bzw. an den Liganden. Helix 7 im mMR ist, verglichen mit der homologen Helix 5 im hGR um etwa 2Å verschoben. Dies soll durch die Mutation M848I „korrigiert“ werden.

Der Serin-Rest an Position 811 stellt eine sterische Barriere dar, die die Annäherung von H7 an H5 im mMR verhindert. Ein Austausch gegen Glycin (S811G) könnte H7 räumlich näher an H5 bringen, wie es auch in der hGR-Struktur der Fall ist. Somit könnte sich die bindungsrelevante Helix 7 im mMR verschieben und sich an die hGR-Struktur angleichen. Die Mutation zweier weiterer Reste sollte durch eine lokale „Korrektur“ der Bindungstasche die Ligandenaffinität des mMR schwächen. Die Substitution von M848 durch das sterisch weniger anspruchsvolle Isoleucin (M848I) schafft Raum in der Bindungstasche. Dadurch könnte H7 näher an den Liganden rücken und eine ähnliche Position wie Helix 5 im hGR einnehmen. Ein dritter Rest, das Glutamin (Q772) in H3 bildet eine Wasserstoff-Brücken-Bindung (H-Brücke) zum Keton am 3. Kohlenstoff (C3) im Dexamethason (Abb. 39). Die Substitution des Glutamins durch das ionische Glutamat (Q772E) verhindert die Ausbildung einer solchen Wasserstoff-Brücke.

Durch die strukturelle Anpassung der bindungsrelevanten Helices im mMR, so wie durch Schwächung der Liganden-Interaktion durch lokale Veränderungen in der mMR-Bindungstasche, sollte der mMR eine Kortikosteron-Affinität erhalten, die der des mGR entspricht.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden verschiedene mMR-Mutanten generiert und funktionell mit den Wildtyp-Rezeptoren mMR und mGR und der mMR-Chimäre verglichen.

4.3.2 Funktionelle Analyse der mMR-Mutanten

Die funktionellen Analysen wurden mittels Reporter-Gen-Experimenten durchgeführt. Die Reporter-Gen-Analysen erfolgten in allen nachfolgend beschriebenen Experimenten im 96-Well-Format. Als Reporter-Plasmid wurde MMTV-Luciferase (*Firefly*), als Transfektionskontrolle die Gaussia-Luciferase verwendet. Um allgemeingültige Vorhersagen über die Aktivität der künftigen transgenen mMR-Mutanten machen zu können, wurden die funktionellen Experimente in verschiedenen Zelltypen durchgeführt.

a) Aktivierung der mMR-GR-LBD-Chimäre durch 100-fach höhere Hormonkonzentrationen verglichen mit mMR-Wildtyp

Zuerst wurde in HEK 293 Zellen untersucht, inwieweit sich die Substitution der mMR-LBD durch die mGR-LBD auf die Responsivität der Chimäre (mCH) verglichen mit den Wildtyp-Rezeptoren auswirkt (Abb. 40).

Verglich man den Anstieg der Rezeptor-Aktivität von mMR und mGR, so fiel auf, dass die Transkription durch den mMR in geringerem Umfang zunahm. Der Grund hierfür war die höhere Basal-Aktivität des mMR (Abb. 40B). Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass das steroidfreie FBS einen bisher nicht identifizierbaren MR-Liganden enthielt, da Experimente mit nur 0,5% steroidfreiem FBS zu einer weitaus geringeren Basal-Aktivität des MR führten (nicht gezeigt für mMR, jedoch für den humanen MR, s. 4.2.5b).

Die relative Rezeptor-Aktivität zeigte, dass der mMR, im Gegensatz zum mGR und mCH bereits durch 0,1 nM Kortikosteron aktiviert wurde. Die mMR-Chimäre (mCH) reagierte, wie der mGR, bei einer etwa 100-fach höheren Hormonkonzentration. Allerdings erreichte die Chimäre nicht das Aktivitätsplateau des mGR, sondern verhielt sich hier wie der mMR (Abb. 40 A).

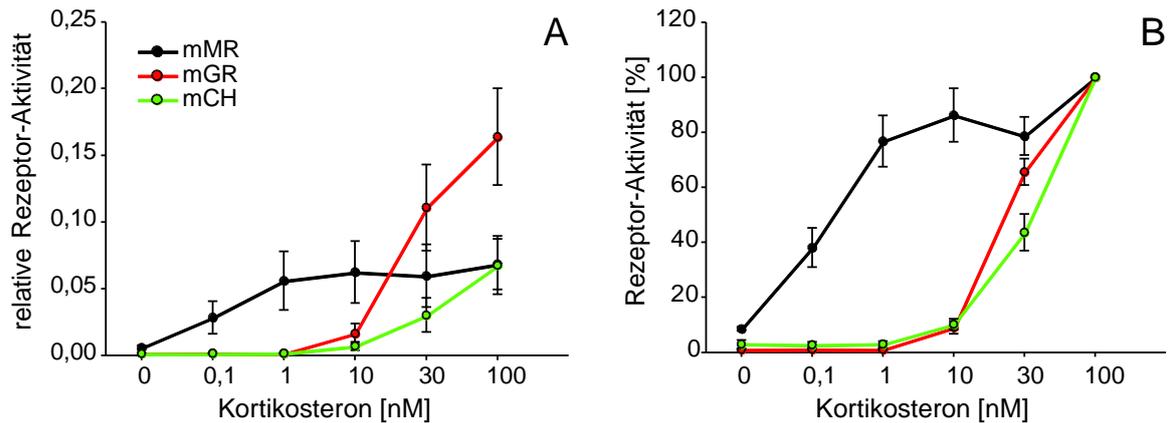


Abbildung 40: Die mMR-Chimäre (mCH) wird, im Gegensatz zum Wildtyp, erst bei 100-fach höheren Hormonkonzentrationen aktiviert. 30000 HEK 293 Zellen wurden mit 25 ng der Expressions-Plasmide für mMR, mGR und mCH sowie 40 ng Reporter-Plasmid MMTV-Luc und 10 ng des Plasmids mit der codierenden Sequenz für eine sekretierte Gaussia-Luciferase (Gaussia) co-transfiziert. Eine bis drei Stunden nach der Transfektion erfolgte die Stimulierung mit Kortikosteron bzw. Ethanol als Kontrolle **(A)** Relative Rezeptor-Aktivität (\pm SEM), dargestellt als die durch die Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte dreier unabhängiger, in Duplikaten durchgeführter Experimente. **(B)** Die Rezeptor-Aktivität bei 100 nM Kortikosteron wurde auf 100% gesetzt und die anderen Aktivitäten hierauf bezogen.

In Abbildung 40B ist eine andere Art der Darstellung gewählt, um die halbmaximale Aktivität der Rezeptoren besser vergleichen zu können. Die Aktivität, die durch Stimulierung mit der höchsten Hormonkonzentration erreicht wurde, wurde als Referenz auf 100% festgelegt. Hier zeigte sich, dass der mMR bereits bei ca. 0,5 nM Kortikosteron, seine halbmaximale Aktivität erreicht hat. Der mGR und mCH hingegen erreichten ca. 50% ihrer Aktivität bei einer Hormonkonzentration zwischen 20 und 40 nM. Somit zeigte die Substitution der mMR-LBD durch die mGR-LBD den gewünschten Effekt bezüglich der Hormonresponsivität. Ähnlich wie der mGR, wurde mCH erst bei fast 100-fach höheren Hormonkonzentrationen aktiv als der mMR.

b) Veränderung der Hormonresponsivität durch Punktmutationen in der mMR-LBD

Im nächsten Schritt wurde die Responsivität der Punktmutanten mMR_Q772E, mMR_S811G und mMR_M848I mit der Hormonantwort von mMR, mGR und mCH verglichen. Hierfür wurden die Reporter-Gen-Experimente in SK-N-MC Zellen durchgeführt (Abb. 41).

Wie auch in HEK 293 Zellen wurde der mGR in der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC bei einer Hormonkonzentration von 10 nM Kortikosteron transkriptionell aktiv. Der mMR reagierte bereits bei einer 100-fach niedrigeren Konzentration von 0,1 nM Kortikosteron. Die Chimäre verhielt sich bezüglich ihrer Hormonabhängigkeit in diesen Zellen ebenfalls wie der mGR (Abb. 41A). Von den drei Punktmutanten des mMR zeigte der Austausch des S811 durch Glycin keine nennenswerte Veränderung in der Responsivität, wenn man die relative Rezeptor-Aktivität betrachtet (Abb. 41A).

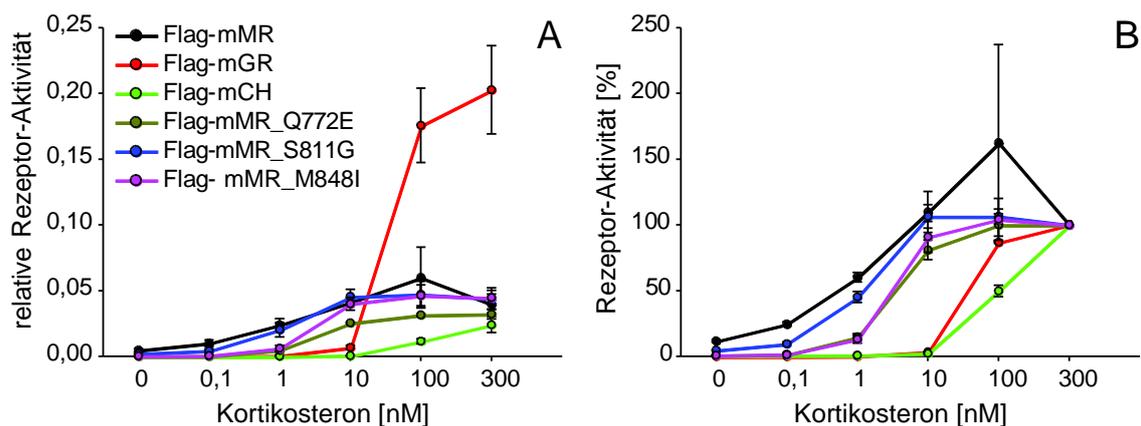


Abbildung 41: Alle drei Mutationen in der mMR-LBD führen zu einer Responsivität des mMR bei vergleichsweise höheren Hormonkonzentrationen. 60000 SK-N-MC Zellen wurden mit 40 ng Reporter-Plasmid MMTV-Luc, 5 ng des Plasmids mit der kodierenden Sequenz für Gaussia-KDEL sowie mit 25 ng der Expressions-Plasmide für Flag-mMR, Flag-mGR, Flag-mCH und der Flag-mMR-Mutanten mit den Mutationen Q772E, S811G und M848I co-transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte die Stimulierung mit steigenden Konzentrationen Kortikosteron bzw. Ethanol **(A)** Relative Rezeptor-Aktivität (\pm SEM), durch die Gaussia-Luciferase normalisierten *Firefly*-Luciferase-Werte dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente, in Duplikaten durchgeführt. **(B)** Die Rezeptor-Aktivität in Anwesenheit von 300 nM Kortikosteron wurde als Referenz auf 100% festgelegt.

Die mMR_Mutanten mit den Substitutionen der Aminosäure-Resten, die die Interaktion mit dem Liganden beeinflussen (Q772E und M848I), wiesen dagegen ein schlechteres Aktivierungspotential auf. Beide Mutanten wurden erst bei einer ca. 10-fach höheren Kortikosteronkonzentration (1 nM) aktiv als der mMR-Wildtyp (Abb. 41A).

Allerdings erreichte die mMR_Q772E-Mutante nicht das vollständige Aktivitätsniveau des Wildtyps. Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn man die Hormonkonzentrationen betrachtete, die zu einer halbmaximalen Aktivität führten (Abb. 41B). Sowohl der mGR als auch mCH erreichten in SK-N-MC Zellen ebenfalls bei einer Hormonkonzentration zwischen 20 und 40 nM Kortikosteron 50% ihrer Gesamt-Aktivität. Hier zeigte sich, dass der S811G-Austausch zu einer geringeren Basalaktivität der Mutante führte, verglichen mit dem Wildtyp mMR. Jedoch wurde bei beiden Rezeptoren bereits mit 1 nM Kortikosteron die Hälfte der transkriptionellen Aktivität erreicht. Somit scheint diese Mutation die Responsivität des mMR nur marginal zu beeinträchtigen. Die anderen beiden Mutanten mMR_Q772E und _M848I waren bei einer Hormonkonzentration von ca. 3-5 nM Kortikosteron zur Hälfte aktiviert.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Mutationen in einem Rezeptor-Molekül kombiniert. Eine Doppelmutante zeigte die gewünschte Responsivität.

c) GR-ähnliche Responsivität durch die Doppelmutation S811G/M848I in der mMR-LBD

Die Ergebnisse der Reporter-Experimente zeigten, dass die mMR-Mutante, die beide Mutationen in H5 (S811G) und H7 (M848I) besaß, in ihrem transkriptionellen Verhalten die größte Ähnlichkeit mit dem mGR aufwies. Um die Responsivität der Doppelmutante (mMR_GI) in den niedrigeren Konzentrationsbereichen besser auflösen zu können, wurde als geringste Hormonkonzentration 0,03 nM Kortikosteron gewählt. Die relative Rezeptor-Aktivität ist wie oben beschrieben in zwei verschiedenen Arten der Darstellung in Abbildung 42 zu sehen.

In diesen Experimenten fiel wiederum die höhere Basalaktivität des mMR auf. Bereits ohne Hormon erreichte der mMR die Hälfte seiner transkriptionellen Aktivität (Abb. 42B). Der murine GR war bei Kortikosteronkonzentrationen zwischen 5-10 nM aktiv und erreichte bei etwa 20 nM die Hälfte seiner Gesamt-Aktivität. Die M848I_Mutante des mMR wurde ab einer Konzentration von 0,03 nM Kortikosteron aktiv (Abb. 42A) und erreichte nach moderatem Anstieg bei ca. 1 nM 50% ihrer transkriptionellen Aktivität.

Ähnliches galt für die Hormonkonzentration, die nötig war, um die Doppelmutante zu aktivieren. mMR_GI startete die Transkription bei einer Hormonkonzentration ab 0,3 nM Kortikosteron. Allerdings war die Mutante, ähnlich wie mGR, bei 10-20 nM Cortison zu 50% transkriptionell aktiv. Darüber hinaus schien diese Mutante bei höheren Hormonkonzentrationen noch stimulierbar zu sein. Anders als der mMR war die maximale Stimulierbarkeit bei 3 nM Kortikosteron noch nicht erreicht (Abb. 42A).

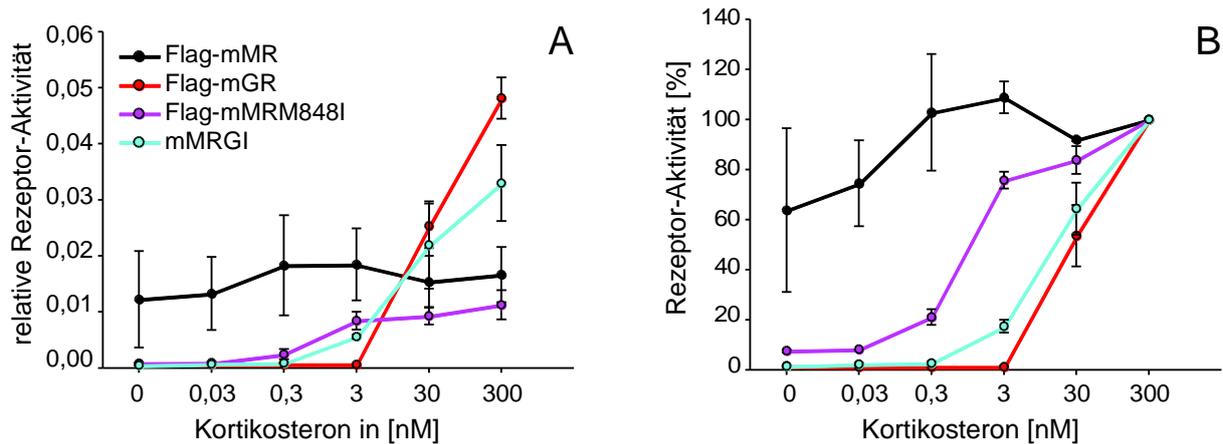


Abbildung 42: Die Doppelmutation S811G/M848I führt zu einer GR-ähnlichen Hormonantwort des mMR. Reporter-Plasmid MMTV-Luc (40 ng), das Expressions-Plasmid für Gaussia-KDEL (5 ng) sowie je 25 ng der einzelnen Plasmide mit der cDNA für Flag-mMR, Flag-mGR, Flag-mMR_M848I und mMR_GI wurden in 30000 HEK 293 Zellen transfiziert. Die Stimulierung der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion mit steigenden Konzentrationen Kortikosteron bzw. Ethanol. **(A)** Dargestellt ist die Rezeptor-Aktivität (\pm SEM), nach Normalisierung der *Firefly*-Werte durch die Gaussia-Werte, zweier unabhängiger, in Duplikaten gemessener Experimente. **(B)** Die Aktivität der Rezeptoren in Anwesenheit von 300 nM Kortikosteron wurde auf 100% festgelegt und als Referenz verwendet.

d) Chimäre und Doppelmutante im Vergleich: zwei mMR-Mutanten mit GR-ähnlicher Responsivität

Der funktionelle Vergleich der beiden mMR-Mutanten wurde in humanen SK-N-MC und murinen Neuro-2A, zwei Neuroblastom-Zelllinien durchgeführt. Neuro-2A Zellen besitzen zwar endogenen mGR, jedoch ist dieser nicht in der Lage, die Transkription am MMTV-Promotor zu induzieren (Dr. Jürgen Zschocke, persönliche Kommunikation). Um die Stimulierbarkeit durch subsaturierende Hormonkonzentrationen besser zu untersuchen, wurden geringere Abstände zwischen den Kortikosteronkonzentrationen in diesem Bereich gewählt. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse dieser Reporter-Gen-Analysen dargestellt.

In beiden Zelllinien war der mMR bereits ohne zusätzliches Hormon auffällig aktiv (Abb. 43 A und C). Da die Neuro-2A Zellen mit maximal 10 nM Kortikosteron stimuliert wurden, lag die Basalaktivität aller Rezeptoren zwischen 20-30% (Abb. 43D).

Ähnlich wie bei mGR (3 nM), waren für die Aktivierung von mCH und mMR_GI höhere Hormonkonzentrationen nötig als für den mMR (Abb. 43 A und C). Abhängig vom Zelltyp wurde mCH erst durch 1 nM (Neuro-2A Zellen) bzw. 3 nM (SK-N-MC Zellen) Kortikosteron transkriptionell aktiv (Abb. 43A und C). Die Transkription durch mMR_GI begann in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1 nM Kortikosteron (Abb. 43B und C).

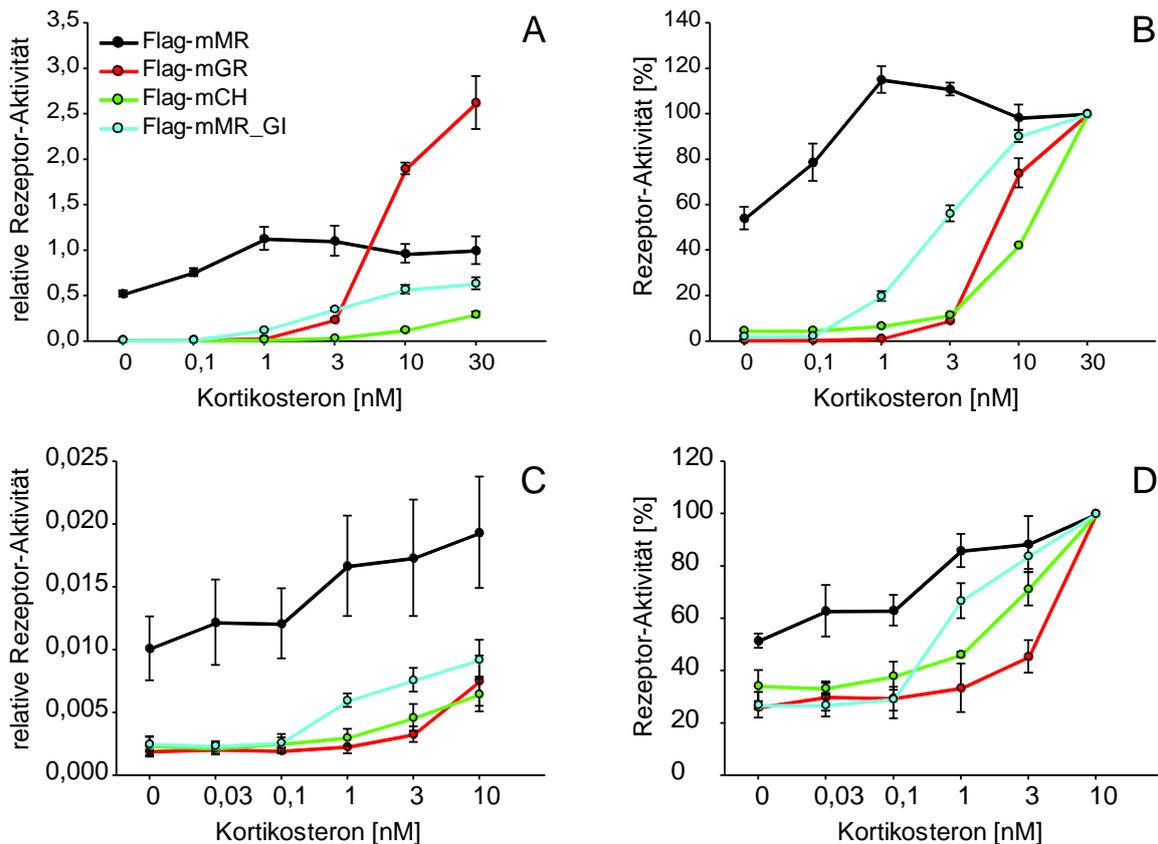


Abbildung 43: Die murine Chimäre und die mMR-Doppelmutante respondieren ähnlich wie der GR in Neuroblastom Zelllinien. 60000 SK-N-MC Zellen und 10000 Neuro-2A Zellen wurden jeweils mit 40 ng Reporter-Plasmid MMTV-Luc, 5 ng des Expressions-Plasmids für Gaussia-KDEL sowie je 25 ng der Plasmide mit der cDNA für Flag-mMR, Flag-mGR, Flag-mMR_M848I und Flag-mMR_GI transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Kortikosteron in einer Konzentration von 0-30 nM stimuliert. Für den unstimulierten Wert wurde Ethanol verwendet. **(A-B)** Ergebnisse der Experimente in SK-N-MC Zellen. Relative, Luc zu Gaussia normalisierte, Rezeptor-Aktivität (\pm SEM) dreier unabhängiger Experimente die in Duplikaten gemessen wurden (A). Die Aktivität der Rezeptoren in Anwesenheit von 30 nM Kortikosteron wurde auf 100% festgelegt und als Referenz verwendet (B). **(C-D)** Ergebnisse der funktionellen Analyse in Neuro-2A Zellen. Links Darstellung der relativen Rezeptor-Aktivität (\pm SEM), durch Normalisierung der *Firefly* Werte zu den Werten der Gaussia Werte, aus drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten (C). Rechts wurde die relative Aktivität bei 10 nM Hormon als Referenz-Wert auf 100% festgelegt (D).

Da die Basal-Aktivität des mMR ohne Hormon schon beträchtlich hoch war, konnte der Unterschied in der halbmaximalen Aktivität zwischen mMR und den Mutanten aus diesen Experimenten nicht bestimmt werden. Da die Neuro-2A Zellen mit nur maximal 10 nM Kortikosteron behandelt wurden, kann die halbmaximale Aktivität einiger Rezeptoren deutlich unter dem Wert aus den vorhergehenden Experimenten liegen.

In SK-N-MC und Neuro-2A Zellen hat der mGR seine halbmaximale Aktivität bei Hormonkonzentrationen von ca. 5-10 nM erlangt. Um 50% der Gesamt-Aktivität zu erreichen, benötigte die Chimäre (mCH) in SK-N-MC-Zellen Hormonkonzentrationen im

Bereich von 10-20 nM. In den Neuro-2A Zellen hingegen waren bereits Konzentrationen zwischen 1-2 nM ausreichend. Die mMR_GI-Doppelmutante benötigte in SK-N-MC Zellen <3 nM, in Neuro-2A Zellen sogar <1 nM Kortikosteron.

Im Vergleich der Hormonresponsivität von mMR, mGR, mCH und mMR_GI wurde deutlich, dass mCH in den Reporter-Experimenten eine stärkere Ähnlichkeit in der Responsivität zur Stimulierbarkeit des mGR aufwies als zum mMR. Auch die Doppelmutationen (S811G/M848I) im mMR generierten einen Rezeptor, der, verglichen mit den mMR Wildtypen, eine ähnliche Responsivität wie der mGR aufwies, allerdings schon bei etwas niedrigeren Hormonkonzentrationen aktiv wurde als dieser.

Durch unterschiedliche Strategien gelang es, zwei mMR-Mutanten zu generieren, die, basierend auf den funktionellen Analysen, in der Lage sein müssten, im Tiermodell unter basalen Bedingungen inaktiv, jedoch unter Stress, die zellulären Funktionen eines MR auszuüben.

5 Diskussion

Glukokortikoide (GCs), wie das Stresshormon Kortisol (Kortikosteron in Ratte und Maus), sind essentiell für die Aufrechterhaltung der basalen und stressbedingten Homöostase in allen höheren Organismen. Die Mediatoren der Effekte von Kortisol sind der Glukokortikoidrezeptor (GR) und der Mineralokortikoidrezeptor (MR). Aufgrund seiner höheren Kortisol-Affinität ist unter basalen Bedingungen der MR aktiv. Da die Kortisol-Affinität des GR um das ca. 10-fache geringer ist, beginnt die GR-abhängige Signaltransduktion erst unter Stressbedingungen, wenn der Kortisolspiegel steigt (Trapp & Holsboer, 1996). Gemeinhin wird davon ausgegangen, dass die Balance zwischen GR- und MR-vermittelter Effekte essentiell für die Homöostase und die Adaption an neue, veränderte Stresszustände ist (de Kloet & DeRijk, 2004).

Maßgeblich für die Aufrechterhaltung dieser regulatorischen Prozesse ist die Funktionsfähigkeit von GR und MR. Eine wichtige Voraussetzung für die Funktion von SR ist die korrekte Faltung. So sind neben den Schlüsselkomponenten Hsc70/Hsp70 und Hsp90 drei weitere Proteine, Hsp40, Hop und p23, für die GR-Faltung relevant (Dittmar *et al.*, 1998). Hsp90- oder Hsc70/Hsp70-abhängige Cofaktoren wie PP5, die Immunophiline FKBP51 und 52, oder der Hsc70/Hsp70 Nukleotid-Austauschfaktor (NEF) BAG-1 können die Faltung, posttranslationale Modifikationen, den nukleären Transport oder auch die DNA-Bindung von SR modulieren und dadurch die Signaltransduktion beeinflussen (Wandinger *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Denny *et al.*, 2000); Wochnik *et al.*, 2005; Kullmann *et al.*, 1998; Kanelakis *et al.*, 1999; Schneikert *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008. Zusätzliche Mechanismen, wie z.B. die ligandenabhängige Regulation der GR-mRNA (Okret *et al.*, 1986; Dong *et al.*, 1988; Burnstein *et al.*, 1994) oder die Proteinstabilität per se (Wallace & Cidlowski, 2001) tragen ebenfalls zur Kontrolle der GR-vermittelten Signalweiterleitung bei. Eine Dysregulation der GR-Signaltransduktion kann unter Umständen zu einer Akkumulation des Stresshormons Kortisol, auch als Hyperkortisolismus bezeichnet, führen. Einhergehend mit erhöhten Kortisolwerten wird mehrfach über die Entwicklung einer Glukokortikoidresistenz berichtet. Dieses Phänomen wird in der klinischen Praxis oft assoziiert mit endogen oder exogen erhöhten Kortisolspiegeln beobachtet, wie sie häufig bei depressiven Patienten oder Patienten, die sich einer Immunsuppressionstherapie unterziehen müssen, vorkommen (Holsboer, 2000; Kino *et al.*, 2003). Da Glukokortikoide starke Immunsuppressiva darstellen und eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen, werden sie überwiegend zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Boumpas *et al.*, 1993; Barnes, 1998). Im Laufe der Jahre wurden einige der molekularen Ursachen erforscht, die im Hinblick auf Entzündungskrankheiten zur Glukokortikoidresistenz führen können (Barnes & Adcock, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit BAG-1M und HspBP1, beides Hsc70/Hsp70-Nukleotid-Austauschfaktoren (NEF), zwei weitere Faktoren untersucht, die die Funktion und

somit Signaltransduktion von SR verändern können. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sich HspBP1 und BAG-1M in dem zugrunde liegenden Mechanismus ihrer Wirkung auf die Funktion von SR unterscheiden.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit untersucht, die transkriptionelle Aktivität des MR durch Mutationen direkt im Rezeptor zu modulieren. Dabei konnten murine MR hergestellt werden, die eine GR-ähnliche Glukokortikoidaffinität aufweisen. Dies diente als Vorarbeit für ein transgenes Tiermodell, in dem ektopisch ein MR überexprimiert wird, der erst unter Stress, also mit steigenden Kortisolkonzentrationen, aktiv wird. In diesem Tiermodell soll in naher Zukunft die Relevanz der MR/GR-Balance für die Aufrechterhaltung der basalen und stressbedingten Homöostase überprüft werden.

5.1 Modulation der Steroidhormonrezeptor-Funktion durch assoziierte Cochaperone

BAG-1 wurde ursprünglich als Bcl2-assoziiertes Athanogen 1 identifiziert (Takayama *et al.*, 1995), und ist mit vier translationalen Isoformen im menschlichen Gewebe vertreten (Yang *et al.*, 1998). Es moduliert als NEF die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 (Takayama *et al.*, 1997; Zeiner *et al.*, 1997; Höfeld & Jentsch, 1997). Mittlerweile wurde die Beteiligung von BAG-1 an der Regulation vieler zellulärer Signalwege nachgewiesen (Alberti *et al.*, 2003b; Gehring, 2004). Zahlreiche Studien befassen sich mit der Eigenschaft von BAG-1, die Signaltransduktion von SR Hsc70/Hsp70-abhängig zu beeinflussen. Die Fähigkeit von BAG-1, verwandte SR auf unterschiedliche Weise zu modulieren, ist nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung interessant, sondern könnte BAG-1 als Zielprotein auch in den Fokus der Entwicklung von Medikamenten zur gezielten Beeinflussung der SR-Signaltransduktion rücken. Im Hinblick auf eine eingeschränkte GR-Signaltransduktion, die als Ursache für den in depressiven Patienten häufig beobachteten Hyperkortisolismus diskutiert wird (Holsboer, 2000), stellt BAG-1M aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die GR-Aktivität einen potentiellen kausalen Faktor für die Ausbildung depressiver Störungen dar.

5.1.1 GR und PR: verschiedene Mechanismen der Inhibition durch BAG-1M?

Für die gezielte Modulation einzelner SR über BAG-1 ist es wichtig, dessen Einfluss auf verwandte Rezeptoren zu kennen. Die Effekte verschiedener BAG-1-Isoformen auf die transkriptionelle Aktivität des GR, AR und ER wurden bereits dokumentiert (Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003; Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003; Cutress *et al.*, 2003). Bisher gab es jedoch keine Untersuchungen bezüglich der Wirkung von BAG-1 auf die Funktion des PR, einen verwandten SR. Der PR, ebenso wie GR und MR in stressrelevanten Hirnregionen exprimiert (Kato, 1994; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; Guerra-Araiza *et al.*, 2003), wird neben der Regulation reproduktiver Prozesse unter anderem auch im Zusammenhang mit der Regulation der Kognition oder Neurogenese diskutiert (Brinton *et al.*, 2008). Daher war ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von BAG-1M, der GR-inhibierenden Isoform, auf die Aktivität des PR zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass BAG-1M einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf die PR-Aktivität aufweist, wie auf die Funktion des GR. Anders als im Falle des GR, war die Inhibition des PR bezüglich der Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit nicht eindeutig interpretierbar. Um die Ergebnisse der funktionellen Analysen bezüglich der Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der PR-Inhibition durch BAG-1M einschätzen zu können, wurden Bindungsanalysen von BAG-1M und verschiedenen PR-Mutanten durchgeführt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der stimulatorische Effekt von BAG-1L auf die AR-Transaktivierung durch eine Abhängigkeit von Hsc70/Hsp70 auszeichnet. Für den GR und den AR wird die Modulation der Transaktivierung durch BAG-1, auf die Beteiligung bestimmter Rezeptor-Domänen zurückgeführt. BAG-1M interagiert Chaperon-abhängig mit der Hinge-Region im GR (Kullmann *et al.*, 1998). Für die Stimulierung durch BAG-1L ist die Interaktion von BAG-1L mit dem N-Terminus des AR notwendig (Shatkina *et al.*, 2003).

Die Interaktionsstudien sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Interaktion des PR mit BAG-1M Hsc70/Hsp70-abhängig erfolgt, ob diese Interaktion von ähnlichen Domänen im PR vermittelt wird, wie für GR oder AR beschrieben, und ob sich aus der Art der Interaktion generell ein Mechanismus für die Regulation der SR-Aktivität durch BAG-1 ableiten lässt.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der funktionellen Analyse sowie der Interaktionsstudien des PR-Wildtyps und der verschiedenen PR-Mutanten mit BAG-1M, Hsc70/Hsp70 und Hsp90 zusammengefasst.

Die Rezeptor-Aktivität betreffend fielen drei Deletionsmutanten auf, PR Δ C, PR Δ H1 und PR Δ 494-562, die eine stärkere transkriptionelle Aktivität aufwiesen als PRwt. Die Deletion der LBD in PR Δ C hatte eine hormonunabhängige Aktivität zur Folge. PR Δ C war aufgrund der, verglichen mit PRwt, stärkeren Expression, transkriptionell stärker aktiv. Die verstärkte Transkriptionsrate von PR Δ H1 und PR Δ 494-562 bei höheren Hormonkonzentrationen könnte in der Deletion einzelner Reste begründet liegen, die möglicherweise durch Modifikationen

und/oder Interaktionen mit bestimmten Cofaktoren die Aktivität negativ regulieren (Knotts *et al.*, 2001).

Tabelle 8: Rezeptor-Aktivität und Interaktionsanalyse von PRwt und PR-Mutanten

Rezeptor	transkriptionelle Aktivität	Bindung an BAG-1M	Interaktion mit Hsc70/Hsp70	Interaktion mit Hsp90
PRwt	+	+	+	+
PR Δ N	-	+	+	+
PR Δ C	++	+	+	-
PR Δ DBD	-	+	+	+
PR Δ H1	++	+	+	+
PR Δ H	-	+	+	+
PR Δ 494-562	++	+	+	+
PR Δ 494-562/ Δ H	-	+	+	+
PR-DBD	n.t.	-	-	-
PR-494-641	n.t.	+	+	-
PR-DBDH	n.t.	+	++	-

Transkriptionelle Aktivität des PR-Wildtyps und der PR-Mutanten sowie ihre Interaktion mit BAG-1M, Hsc70/Hsp70 und Hsp90. Die Aktivität der Rezeptoren wurde jeweils in Bezug auf PRwt (+) angegeben. (++) bedeutet verstärkte transkriptionelle Aktivität, (-) bezeichnet nicht aktive bzw. schwach aktive Mutanten, (n.t.) nicht getestete Konstrukte. Die Bindung an BAG-1M und die Chaperone wurde ebenfalls mit (+) Bindung, (++) sehr gute Bindung und (-) keine Bindung bewertet. Die Interaktion mit Hsc70/Hsp70 ist essentiell für die Bindung an BAG-1M.

Die Deletion des N-Terminus verringerte deutlich die Expression von PR Δ N, was eine plausible Erklärung für dessen schwache Aktivität war. Möglicherweise ist die Deletion von Ser 400, dessen Phosphorylierung zur Stabilität des PR beiträgt (Faus & Haendler, 2006), die Ursache für die geringen PR Δ N-Spiegel. Der Verlust der DBD führte wie erwartet zu einem kompletten Aktivitätsverlust. Die Deletion der gesamten Hinge-Region in PR Δ H verursacht unter Umständen eine strukturelle Instabilität, wodurch keine adäquate Faltung mehr möglich ist. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete Inaktivität ist der Verlust wichtiger regulatorischer Reste in der Hinge-Region (Knotts *et al.*, 2001). Dies würde auch die Inaktivität der Mutante PR Δ 494-562/ Δ H erklären.

In den Bindungsanalysen wurde festgestellt, dass PR-DBD die einzige PR-Mutante war, die nicht mit BAG-1M interagierte. PR Δ DBD hingegen wurde mit BAG-1M copräzipitiert. Weder die Deletion der Hinge-Region (H1 und H) noch des N- bzw. C-Terminus oder einer der anderen Domänen führten zum Verlust der Bindung an BAG-1M. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, anders als bei GR oder AR, mehr als eine Domäne

des PR die Bindung an BAG-1M und damit die Inhibition der PR-Funktion vermittelt. Somit ist der inhibitorische Effekt von BAG-1M auf die Aktivität von SR nicht generell durch eine Interaktion mit der Hinge-Region der Rezeptoren zu erklären.

Basierend auf diesen Interaktionsanalysen und den Ergebnissen der Reporter-Experimente stellte sich die Frage nach der Relevanz von Hsc70/Hsp70 bei der Vermittlung der Bindung des PR an BAG-1M. Hierzu wurde die Bindung von Hsc70/Hsp70 an die verschiedenen PR-Mutanten untersucht. Es stellte sich heraus, dass auch hier, mit Ausnahme von PR-DBD, alle PR-Mutanten in der Lage waren, mit dem Faltungshelfer zu interagieren. Die Bindungsanalysen mit einer Hsc70/Hsp70-Interaktionsmutante von BAG-1M (BAG-1M_mut) zeigten, dass Hsc70/Hsp70 essentiell für die Bindung an BAG-1M ist. BAG-1M_mut wurde weder mit PRwt noch mit den PR-Mutanten copräzipitiert. Die Bindungsstudien mit PR-DBD, dem einzigen Konstrukt, das weder eine Bindung an BAG-1M noch an Hsc70/Hsp70 aufwies, unterstützten diese Beobachtung.

Auch wenn die Hinge-Region nicht alleine entscheidend war, schien sie dennoch eine Schlüsselrolle für die Chaperon-Assoziation einzunehmen. Die Untersuchungen von PR-DBDH ergaben, dass das Anfügen der Hinge-Region an PR-DBD zu einer stärkeren Bindung von Hsc70/Hsp70 führte. Diese Beobachtung stimmte mit einer Studie überein, in der die Hinge-Region im Vitamin D Rezeptor (VDR) als Bindungsstelle für DnaK, das bakterielle Hsp70-Homolog identifiziert wurde (Swamy *et al.*, 1999). Die Hsp90-Bindung des PR war, wie erwartet, nicht relevant für die Interaktion mit BAG-1M. Sowohl PRAC als auch die PR-Fragmente PR-DBD, PR-494-641 und PR-DBDH konnten nicht mehr an Hsp90 binden, da mit der Deletion der LBD die Bindungsstelle der SR für Hsp90 entfernt wurde (Xu *et al.*, 1998; Carsonjurica *et al.*, 1989; Schowalter *et al.*, 1991; Chambrud *et al.*, 1990). Bis auf PR-DBD interagierten sie jedoch alle mit BAG-1M und Hsc70/Hsp70.

Die hier beschriebenen Daten führen zu der Annahme, dass dem inhibitorischen Effekt von BAG-1M auf die transkriptionelle Aktivität des PR wahrscheinlich ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt, als er für den GR bekannt ist (Kullmann *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2008). Weder die Hinge-Region noch Hsc70/Hsp70 scheinen in vergleichbarem Ausmaß an der Vermittlung der PR-Inhibition durch BAG-1M beteiligt zu sein, wie es auf die Regulation der GR-Aktivität zu trifft. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, worin der Unterschied in der Regulation der beiden SR begründet liegt.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass GR und PR unterschiedliche Chromatin-Modulatoren für die Transkription rekrutieren (Archer *et al.*, 1997). So rekrutiert der GR Faktoren, die zur Modifikationen des Histons H3 führen, der PR hingegen Cofaktoren die zu einer erhöhten Azetylierung des Histons H4 führen (Li *et al.*, 2003). Dies würde die differenzielle Aktivierung verschiedener Promotoren durch GR und PR erklären (Deroo & Archer, 2002).

Somit könnte BAG-1M durch direkte, also Hsc70/Hsp70-unabhängige, oder indirekte Interaktion mit einem oder mehreren Cofaktoren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität

der SR nehmen. Laut Literatur interagiert BAG-1M auch Chaperon-unabhängig mit Transkriptionsfaktoren (Niyaz *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit der Hsc70/Hsp70-unabhängigen Vermittlung bietet die Bindung an die proteasomalen Untereinheiten Rpt4 und Rpt6, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Ein Unterschied in der Relevanz verschiedener proteasomaler Untereinheiten für die hormoninduzierte Transkription durch GR oder PR könnte eine Erklärung für die gegensätzliche Wirkung sein, die Proteasom-Inhibitoren (z.B. MG132) auf die Transaktivierung der beiden Rezeptoren zeigen. Im Gegensatz zum GR, dessen transkriptionelle Aktivität durch die Inhibition von MG132 hormonabhängig verstärkt wird, führt die Verwendung von MG132 zur Inhibition der PR-abhängigen Transkription (Kinyamu & Archer, 2007; Dennis *et al.*, 2005). Die Blockade der transkriptionellen PR-Aktivität durch MG132 geht nicht nur mit einer Inhibition der progesteronabhängigen Azetylierung des Histons H4, sondern auch mit einer Inhibition der progesteronabhängigen Rekrutierung der RNA-Polymerase II einher (Dennis *et al.*, 2005). Bis vor kurzem war keine Literatur darüber vorhanden, ob BAG-1M, abhängig oder unabhängig von proteasomalen Untereinheiten oder Hsc70/Hsp70, Chromatin-Modulatoren wie z.B. Histon-Deazetylasen (HDACs) oder –Azetyltransferasen (HATs) rekrutiert oder deren Rekrutierung verhindert. In einer aktuellen Publikation wurde die Notwendigkeit von HDAC und Corepressoren für die BAG-1M-vermittelte GR-Inhibition berichtet (Hong *et al.*, 2009). Die unspezifische Bindung von BAG-1 an DNA (Kullmann *et al.*, 1998; Zeiner *et al.*, 1999; Niyaz *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008) könnte durch eine Interaktion mit bestimmten HDACs, HATs oder anderen Faktoren zu einer lokalen Veränderung der Chromatinstruktur führen und somit die Promotor-Bindung der RNA-Polymerase II und anderer Cofaktoren verhindern. Dies könnte auch die Bindung des PR selbst betreffen. Allerdings scheint die Histon-Deazetylierung eine Begleiterscheinung der MG132-induzierten PR-Inhibition zu sein, und nicht die Ursache dafür, dass die RNA-Polymerase II nicht mehr an PR-responsive Promotoren bindet (Dennis *et al.*, 2005).

Ob Veränderungen der Chromatin-Struktur durch BAG-1 erfolgen und inwieweit die Beteiligung proteasomaler Untereinheiten und deren proteolytische oder Proteolyse-unabhängige Funktion eine Rolle spielen, muss erst noch untersucht werden. Es ist wahrscheinlich, dass der Unterschied in der Wirkung von BAG-1M auf die Aktivität des GR und PR durch eben genannte Faktoren sowohl promotor- als auch zelltypabhängig ist. Auf jeden Fall könnte eine Hsc70/Hsp70-unabhängige Regulation transkriptioneller Prozesse durch BAG-1 ein Grund für die beobachteten Unterschiede in der Regulation der transkriptionellen Aktivität verschiedener SR durch die BAG-1-Isoformen sein. Ein erster Ansatz für eine detailliertere Analyse wäre ein Vergleich der BAG-1M-vermittelten Wirkung auf die GR und PR-Aktivität an endogenen Promotoren. Protein-DNA und Protein-Protein Interaktionsanalysen sind eine probate Methode herauszufinden, ob BAG-1M auch mit dem PR an der DNA präzipitiert werden kann und inwieweit proteasomale Untereinheiten beteiligt sind. Darüber hinaus könnte in Co-Immünpräzipitationsexperimenten mit den verschiedenen

BAG-1-Isoformen geprüft werden, ob ein Unterschied im Interaktionsprofil mit bekannten Chromatin-Modulatoren besteht. Dies könnte weiter zu Klärung der Rolle von BAG-1 in der Modulation der SR-abhängigen Transaktivierung beitragen.

5.1.2 Funktion der *ubiquitin-like*-Domäne von BAG-1M für die Regulation der Steroidhormonrezeptoren

Neben ihrer Funktion als NEF, über die Hsc70/Hsp70 Chaperon-Aktivität die Signaltransduktion von SR zu beeinflussen, sind die BAG-1-Isoformen an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Hierzu zählen die Modulation transkriptioneller Prozesse auf DNA-Ebene durch BAG-1M (Kullmann *et al.*, 1998; Zeiner *et al.*, 1999; Niyaz *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008) oder auch die Beteiligung am proteasomalen Abbau von Chaperon-Substratproteinen wie des GR in Kooperation mit der E3-Ligase CHIP (Lüders *et al.*, 2000a; Alberti *et al.*, 2003a; Demand *et al.*, 2001). In den meisten Fällen agiert BAG-1 in Abhängigkeit von Hsc70/Hsp70. Die Vernetzung der Proteinfaltung mit dem Proteinabbau, die der Qualitätskontrolle dient, wird von BAG-1 über seine Ubiquitin-ähnliche Domäne (ULD, *ubiquitin-like domain*) vermittelt (Lüders *et al.*, 2000a; Alberti *et al.*, 2003a). Wie andere Proteine, die ebenfalls eine ULD besitzen (Elsasser *et al.*, 2002), interagiert BAG-1M sehr wahrscheinlich mit Rpn1, einer nicht-ATPase Untereinheit des 19S-regulatorischen Komplexes des 26S-Proteasoms.

In dieser Arbeit wurden zwei weitere proteasomale Untereinheiten des 19S-Komplexes als Interaktionspartner für BAG-1M identifiziert, Rpt4 und Rpt6. Da beide Proteine mit Rpn1 im selben Modul organisiert sind, ist es wahrscheinlich, dass die Bindung von BAG-1M an Rpt4 und Rpt6 von Rpn1 vermittelt wird. Die Bindung ist Hsc70/Hsp70-unabhängig. Desweiteren war die Coexpression von BAG-1M und GR mit einer starken Reduktion der GR-Proteinmenge verbunden (s. 4.2.7b, Abb. 32). Im Gegensatz dazu gab es in den Expressionsanalysen der funktionellen Experimente keinen Hinweis auf eine ähnlich stark verminderte GR-Expression (Abb. 23). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der verwendeten Methode liegen. Die Zellen für die funktionellen Analysen wurden nach der Cotransfektion von BAG-1M und GR mit Hormon behandelt (s. 4.2.5a). Im Gegensatz dazu wurden für die Hormonbindungsanalyse, deren Extrakt die stärkste GR-Reduktion in Anwesenheit von BAG-1M aufwies, das Zytosol lysierter Zellen mit Hormon (s. 4.2.7b) versetzt. Dies kann bedeuten, dass die Bindung des Liganden den GR unter bestimmten Bedingungen vor dem CHIP-abhängigen proteasomalen Abbau durch BAG-1M schützt. Es kann auch bedeuten, dass BAG-1M den CHIP-induzierten proteasomalen Abbau des Liganden-gebundenen GR verhindert. Bekanntermaßen führen Glukokortikoide zu reduzierten GR-Spiegeln (McIntyre & Samuels, 1985; Wallace & Cidlowski, 2001). Es ist vorstellbar, dass BAG-1M in seiner Eigenschaft als transkriptioneller Stimulator (Niyaz *et al.*, 2003; Zeiner *et al.*, 1999) den ligandeninduzierten GR-Abbau durch Hochregulation von

Faktoren, die zur Stabilisierung des GR beitragen, verhindert. Auf diesem Weg könnte BAG-1M in die GR-abhängige Transkription in einem bestimmten zellulären Kontext aufrechterhalten oder stimulieren. Eine entscheidende Komponente hierfür könnte sowohl das Verhältnis von BAG-1M zu CHIP sein, als auch die Anwesenheit von Hormon. Ein Argument für diese Hypothese ist die Beobachtung, dass in der hippocampalen Zelllinie HT22, in der kein endogenes CHIP detektiert wurde, die Langzeit-Behandlung mit Glukokortikoiden keinen Einfluss auf die GR-Spiegel hat (Wang & DeFranco, 2005). Erst die Überexpression von CHIP bewirkt eine glukokortikoidabhängige Reduktion des GR-Proteins (Wang & DeFranco, 2005).

Im Zusammenhang mit dem negativen Einfluss von BAG-1M auf die GR-Aktivität (Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003) einerseits und der CHIP-induzierten proteasomalen Degradation des GR andererseits (Demand *et al.*, 2001), stellt sich die Frage, ob nicht primär der GR-Abbau zu einer geringeren transkriptionellen Aktivität führen könnte. Aus diesem Grund wurde eine BAG-1M-Mutante hergestellt, in der die Reste der ULD deletiert wurden (BAG-1M_Ubidel). Diese Mutante war nicht mehr in der Lage, mit Rpt6 zu interagieren. Der Einfluss dieser Mutante auf Hsc70/Hsp70-abhängige Prozesse wurde zuerst mittels einer konstitutiv aktiven *Firefly*-Luciferase getestet. Dieses häufig als Reportergen verwendete Enzym ist in seiner Faltung und somit auch in seiner Aktivität Chaperon-abhängig. Hierbei stellte sich heraus, dass BAG-1M_Ubidel konzentrationsabhängig zu einer stark reduzierten *Firefly*-Luciferase-Aktivität führt. Die Co-Immünpräzipitationsexperimente bestätigten, dass die Interaktion mit proteasomalen Untereinheiten unabhängig von der Bindung an Hsc70 war (Abb. 21 und 22). BAG-1M_Ubidel ist demnach in der Lage, die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 zu modulieren. Allerdings fehlt die regulatorische Komponente für die Qualitätskontrolle der Proteinfaltung. Durch die Deletion der UL-Domäne kann BAG-1M_Ubidel die Proteinfaltung bei Bedarf nicht mehr mit dem Proteinabbau koordinieren. Dies würde den inhibitorischen Effekt von BAG-1M_Ubidel auf die Aktivität der *Firefly*-Luciferase erklären. Da die optimale Bedingung dieses Enzyms aufgrund seiner Herkunft höchstwahrscheinlich nicht bei 37°C, sondern eher bei 25°C liegt, ist es in Zellkultur vermutlich ständigen Faltungsprozessen unterworfen, gefolgt vom Abbau zur Erhaltung des intrazellulären Gleichgewichts. Da BAG-1M_Ubidel nicht mehr in der Lage ist, das dynamische Gleichgewicht zwischen Faltung und Abbau fehlgefalteter Luciferase zu gewährleisten, ist die Konsequenz vermutlich eine Akkumulation inaktiver Luciferase. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung wurde der Einfluss dieser Mutante auf die transkriptionelle Aktivität des GR, MR und AR untersucht.

Überraschenderweise inhibierte diese Mutante konzentrationsabhängig die Aktivität des GR und MR stärker als BAG-1M Wildtyp. Dieser Effekt ging über den direkten Einfluss auf die Reportergen-Aktivität hinaus. Die stärkste Inhibierung der Rezeptor-Aktivität wurde bei subsaturierenden Hormonkonzentrationen beobachtet. Mit steigenden Hormonkonzentrationen nahm der inhibitorische Einfluss ab und entsprach bei maximaler

Hormonkonzentration in etwa dem direkten Effekt von BAG-1M_Ubidel auf die Aktivität der *Firefly*-Luciferase.

Auf die Aktivität des AR wies BAG-1M_Ubidel bei der höchsten Plasmid-DNA Menge keinen nennenswerten Unterschied zu BAG-1M Wildtyp auf. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturangaben bezüglich des Einflusses von BAG-1L und einer ULD-Deletionsmutante von BAG-1L überein (Knee *et al.*, 2001).

Auffällig waren die Effekte, die BAG-1M_Ubidel bereits in geringen Konzentrationen auf die Aktivität des GR und AR ausübte. In beiden Fällen stimulierte schon die geringste Menge BAG-1M_Ubidel-Plasmid deutlich die Rezeptor-Aktivität. Würde BAG-1M unter diesen experimentellen Bedingungen zum proteasomalen Abbau der Rezeptoren führen, hätte eine Deletion der ULD-Domäne diesen gegenteiligen, stimulierenden, Effekt. In diesem Zusammenhang würde man eine erhöhte Expression der Rezeptoren erwarten. Die Expressionsanalyse ergab jedoch keine Veränderung in der Proteinmenge der Rezeptoren; somit kann diese Erklärungsmöglichkeit ausgeschlossen werden. Da in den verwendeten Zellen auf Proteinebene kein endogenes BAG-1 detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), ist anzunehmen, dass die Rezeptor-Stimulierung durch die exogene Menge BAG-1M_Ubidel bewirkt wurde. Diese Beobachtung stimmt mit Studien überein, in denen die positiven oder negativen Effekte von BAG-1 auf die Hsp90-Hsc70/Hsp70 Chaperon-Maschinerie auf das Verhältnis von BAG-1 zu Hsc70/Hsp70 und auch auf die Komposition zwischen Chaperonen und verschiedenen Cofaktoren zurückgeführt werden (Kanelakis *et al.*, 1999; Tzankov *et al.*, 2008). Somit würde in Gegenwart geringer Konzentrationen BAG-1M_Ubidel der positive Einfluss auf Hsc70/Hsp70 dominieren, wie es auch in unseren Experimenten beobachtet wurde.

Schwieriger ist es, den verstärkten inhibitorischen Effekt von BAG-1M_Ubidel auf die Aktivität des GR und MR zu erklären. Hierbei könnte die Beteiligung proteasomaler Untereinheiten des 19S-Komplexes, wie Rpt4 und Rpt6, an transkriptionellen Prozessen eine Rolle spielen. In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass proteasomale Untereinheiten neben ihrer proteolytischen Funktion auch Proteolyse-unabhängig zelluläre Prozesse, wie z.B. die Transkription, beeinflussen. Bereits 1995 wurde festgestellt, dass Sug1, das Hefehomolog zu Rpt6, durch einen möglicherweise antagonistischen Effekt auf die Coaktivator-Funktion von Cdc68 zur Repression der Transkription *in vivo* führt (Xu *et al.*, 1995). Auch über eine Mitwirkung von Sug1 (Rpt6) an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur wurde berichtet (Russell *et al.*, 1999b). Wenige Jahre später wurde die Notwendigkeit des regulatorischen Komplex 19S des Proteasoms nicht nur für die Elongation in Hefe, sondern generell für die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription in Eukaryoten aufgeklärt (Ferdous *et al.*, 2001; Ferdous *et al.*, 2002). Dies wurde ebenfalls, teilweise indirekt, bei der SR-abhängigen Transkription beobachtet. Für den AR scheint die Inhibition des Proteasoms durch MG132 die Freisetzung des AR vom Promotor des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) zu verhindern, und somit die dynamische Zusammenlagerung des AR-

Transkriptionskomplexes zu beeinflussen (Kang *et al.*, 2002). Auch die PR- und GR-abhängige Transkription werden durch die Inhibition des 26S Proteasoms mit MG132 moduliert (Dennis *et al.*, 2005; Kinyamu & Archer, 2007).

Im Falle des GR wird die hormonabhängige Transkriptionsaktivität am stabil integrierten MMTV-Promotor durch MG132 deutlich verstärkt. Dieser Effekt wurde nicht mit dem Einfluss auf die Rezeptor-Stabilität, sondern mit der Beteiligung von Sug1 (Rpt6) assoziiert. Die Depletion von Sug1 (Rpt6) fördert die hormonabhängige transkriptionelle Aktivität des GR (Kinyamu & Archer, 2007). Ein weiteres Argument hierfür war der für die hormonabhängige Reduktion der GR-Proteinmenge wirkungslose *knock down* von Sug1 (Kinyamu & Archer, 2007). Basierend auf diesen Literaturangaben ergibt sich folgende Hypothese, um den verstärkten inhibitorischen Effekt von BAG-1M_Ubidel auf die GR- und MR-Aktivität zu erklären:

Nach der Behandlung mit Glukokortikoiden wird BAG-1M Hsc70/Hsp70-abhängig mit dem GR an hormonresponsive Elemente rekrutiert und kontrolliert die DNA-Bindung des GR (Hong *et al.*, 2008). Durch seine UL-Domäne bindet BAG-1M an die proteasomalen Untereinheiten und rekrutiert deren transkriptionelle Komponenten. Die Deletion der UL-Domäne in BAG-1M hätte während der GR-abhängigen Transkription den Regulationsverlust der proteasomalen Untereinheiten zur Folge und somit ebenfalls eine stärkere GR-Inhibition. Da die Inhibition des Proteasoms mit MG132 je nach SR, und offenbar auch je nach Zelltyp, unterschiedliche Auswirkungen hat (Kang *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2004; Dennis *et al.*, 2005; Kinyamu & Archer, 2007), wäre es denkbar, dass verschiedene proteasomale Untereinheiten, SR-abhängig, differenziell auf transkriptionelle Prozesse wirken. Dies ist im Einklang mit dem Befund, dass BAG-1M_Ubidel in der Lage ist, die GR-Aktivität zu inhibieren, nicht aber die AR-Aktivität. Transkriptionelle Prozesse müssen sehr dynamisch und kontrolliert ablaufen, damit sich die Zelle schnell und effizient an neue Gegebenheiten, wie z.B. Stress, anpassen kann. Die dynamische Zusammen- und Umlagerung transkriptioneller Komplexe wird auch bei SR-abhängiger Transkription durch zyklischen Abbau der beteiligten Komponenten reguliert (Kang *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003). Daher ist es vorstellbar, dass BAG-1M sowohl die proteolytischen, als auch die Proteolyse-unabhängigen Funktionen proteasomaler Untereinheiten während der Transkription SR-abhängig moduliert. So könnte der Abbau oder die Interaktion mit verschiedenen Chromatin-Modulatoren (z.B. HDACs, HATs), Coaktivatoren oder Corepressoren reguliert werden. Auf diese Art könnte die transkriptionelle Aktivität der SR durch BAG-1M an die jeweiligen zellulären Bedürfnisse, adaptiert werden. Der über die proteasomalen Untereinheiten Hsc70/Hsp70-unabhängige Mechanismus würde die Hsc70/Hsp70-abhängigen Prozesse von BAG-1M komplementieren. Vermutlich überwiegt in Abhängigkeit der vorhandenen Menge BAG-1M und des vorhandenen Rezeptors die Funktion auf Hsc70/Hsp70 und/oder auf die proteasomalen Untereinheiten.

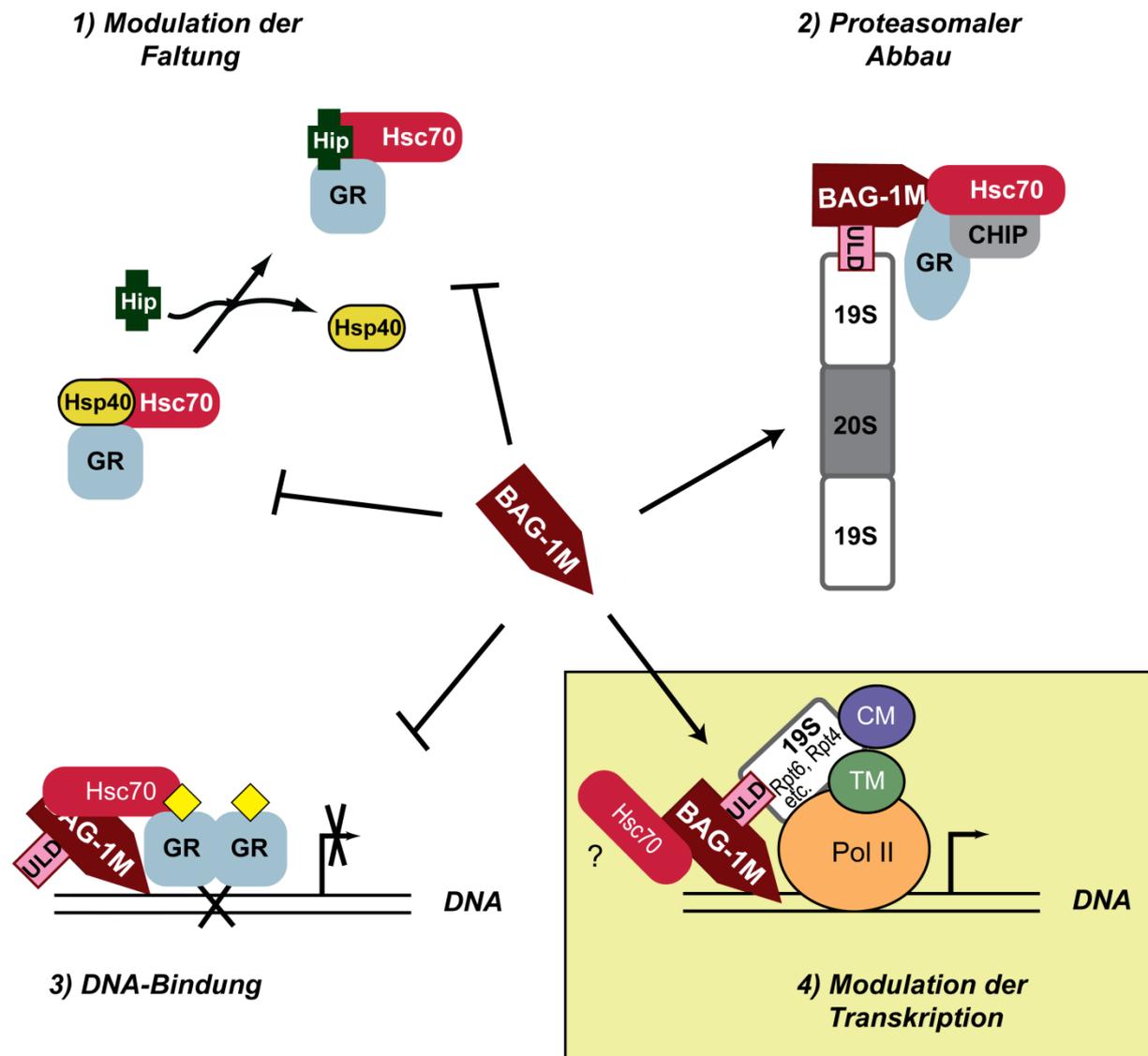


Abbildung 44: Modell zu Hsc70/Hsp70-abhängigen und –unabhängigen Mechanismen der Wirkung von BAG-1 auf die Steroidhormonrezeptoren . Für die Modulation der Faltung (1), den proteasomalen Abbau (2), wie auch die Inhibition der DNA-Bindung des GR (3), wurde die Hsc70-Abhängigkeit in verschiedenen Studien gezeigt. Die Modulation transkriptioneller Prozesse (4) durch BAG-1 ist aber offenbar primär von der UL-Domäne und der Bindung an die DNA abhängig. Hsc70 repräsentiert hier beide Isoformen, Hsp70 und Hsc70. (CM: Chromatin-Modulatoren, TM: Transkriptions-Modulatoren (Coaktivatoren, Corepressoren)).

In Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur demonstrieren die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass BAG-1M ein Protein ist, das auf verschiedenen Ebenen und auf unterschiedliche Art und Weise zur Regulation der SR-Signaltransduktion beitragen kann (Abb. 44). Einerseits beeinflusst es die Proteinfaltung und dient in diesem Zusammenhang wahrscheinlich der Qualitätskontrolle, um die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten. Auf der anderen Seite ist BAG-1M in der Lage, Hsc70/Hsp70 abhängig (Niyaz *et al.*, 2003), und möglicherweise auch Chaperon-unabhängig, die transkriptionelle Aktivität induzierbarer Transkriptionsfaktoren wie GR, MR, AR und PR, durch die Interaktion mit proteasomalen Untereinheiten zu modulieren. Die Relevanz der UL-Domäne von BAG-1M für die Koordination unterschiedlicher Aktionsmodi, um diese kontrolliert und reguliert an zelluläre Bedürfnisse anzupassen, wurde in dieser Arbeit unterstützt. Darüber hinaus könnte eine potentiell Hsc70/Hsp70-unabhängige Regulation der Transkription, vermittelt durch die UL-Domäne von BAG-1, eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der BAG-1 Isoformen auf verschiedene SR sein (Cutress *et al.*, 2003; Froesch *et al.*, 1998; Guzey *et al.*, 2000; Kullmann *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2003; Schneikert *et al.*, 1999; Shatkina *et al.*, 2003). Um Klarheit bezüglich der Relevanz proteasomaler Untereinheiten bei der transkriptionellen Regulation verschiedener SR zu erlangen, sind weiterführende Experimente notwendig. Zum einen muss geklärt werden, ob und gegebenenfalls welche proteasomale Untereinheiten mit BAG-1M und anderen BAG-1-Isoformen an Promotoren assoziiert sind. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die Deletion der ULD einen Einfluss auf diese Assoziationen hat. In diesem Zusammenhang könnte eine Mutante von BAG-1M, die weder mit Hsc70/Hsp70 noch mit dem Proteasom interagiert, Aufschluss über die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit einer möglichen ULD-abhängigen transkriptionellen Regulation geben. Abhängig von diesen Befunden wäre es interessant zu erfahren, inwieweit sich die Komposition transkriptioneller Komponenten der verschiedenen SR in Anwesenheit von BAG-1-Isoformen verändern.

5.1.3 Der mechanistische Unterschied zwischen BAG-1M und HspBP1 in der Regulation der Steroidhormonrezeptor-Funktion

Die meisten Funktionen von BAG-1 sind Hsc70/Hsp70-abhängig (Townsend *et al.*, 2005) und wahrscheinlich in der Modulation der Chaperon-Aktivität begründet (Höhfeld & Jentsch, 1997; Takayama *et al.*, 1997; Zeiner *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu BAG-1 ist über das Hsp70-bindende Protein 1 (HspBP1) weit weniger bekannt. Erst kürzlich wurde in einer Studie festgestellt, dass HspBP1 als alternativer NEF für Hsp70 dient und, als funktionelles Homolog zu BAG-1M, unterschiedlich auf die Struktur der ATPase-Domäne von Hsp70 wirkt (Shomura *et al.*, 2005).

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M auf die SR-Signaltransduktion verglichen. Neben funktionellen Analysen, die SR-Aktivität betreffend, boten Interaktionsstudien mit faltungsrelevanten Cofaktoren die Möglichkeit, gegebenenfalls Unterschiede in der Regulation von Hsc70/Hsp70 zu entdecken. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu BAG-1M und HspBP1 Mutanten untersucht, die nicht mehr an Hsc70/Hsp70 binden und dessen Chaperon-Aktivität beeinflussen (BAG-1M_mut und HspBP1_mut). Die daraus resultierenden Ergebnisse ließen bereits auf einen Teilaspekt des zugrundeliegenden Mechanismus der Hsc70/Hsp70-abhängigen Modulation der SR-Signaltransduktion durch BAG-1M und HspBP1 schließen.

Als Modelle wurden der GR, AR und MR verwendet. Alle drei Rezeptoren werden Hsc70/Hsp70-abhängig gefaltet, um ihre funktionelle dreidimensionale Struktur zu erlangen. Besonders aufgrund der unterschiedlichen Wirkung von BAG-1M auf die Funktion des GR (Inhibition), AR (kein Einfluss) und MR (kein Einfluss bekannt) boten sie ein gutes Vergleichsmodell für die Aufklärung mechanistischer Unterschiede von HspBP1 und BAG-1M.

a) BAG-1M stimuliert die Transaktivierung des GR und AR bei geringer Überexpression

Bisher war bekannt, dass eine Überexpression von BAG-1M die GR-abhängige Transkription inhibiert (Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003) und keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des AR besitzt (Froesch *et al.*, 1998; Shatkina *et al.*, 2003).

In unserem System führte die Überexpression von BAG-1M mit steigenden Mengen Plasmid-DNA wie erwartet zu einer Reduktion der GR-Aktivität. Überraschenderweise scheint BAG-1M bei geringeren Plasmidmengen zu einer Verstärkung der GR-abhängigen Transkription zu führen. Gleiches galt für BAG-1M_Ubidel. Der inhibitorische Einfluss von BAG-1M ist von der Interaktion mit Hsc70/Hsp70 abhängig. Die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der GR-Stimulierung ist nicht im selben Ausmaß erkennbar wie im Falle der GR-Inhibition. Am stärksten war der inhibitorische Effekt bei subsaturierenden Hormonkonzentrationen (10

nM). Mit steigenden Kortisolkonzentrationen nahm der inhibitorische Einfluss von BAG-1M ab.

Interessanterweise förderte BAG-1M, in geringem Maße überexprimiert, die AR-Transaktivierung. Entgegen bisherigen Literaturangaben scheint BAG-1M ebenso wie BAG-1L, die transkriptionelle Aktivität des AR zu stimulieren. Ebenso wie für BAG-1L ist die Interaktion von BAG-1M mit Hsc70/Hsp70 notwendig für diese Funktion.

Ein Grund für diese beobachtete Aktivitätssteigerung durch BAG-1M könnte in der verwendeten Menge Plasmid-DNA und daher in der exprimierten Menge BAG-1M liegen. Mit steigenden Mengen BAG-1M-Plasmid nahm die AR-Stimulierung ab und erreichte das Kontrollniveau. Auch mit der höchsten Plasmidmenge hatte BAG-1M wie erwartet keinen inhibitorischen Einfluss auf die AR-Aktivität. Offenbar wirkte BAG-1M konzentrationsabhängig auf die GR- und AR-Aktivität. Da BAG-1M_Ubidel denselben Effekt hatte (vgl. 4.2.5), BAG-1M_mut hingegen nicht, scheint diese Funktion von BAG-1M in erster Linie Hsc70/Hsp70-abhängig zu sein. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturangaben, denen zufolge das Verhältnis von BAG-1M zu Hsc70/Hsp70 für die Wirkung von BAG-1M entscheidend ist (Kanelakis *et al.*, 1999; Tzankov *et al.*, 2008).

Eine andere mögliche Erklärung könnte in der intrazellulären Lokalisation von BAG-1M liegen. In einer Studie, die den positiven Einfluss der verschiedenen BAG-1-Isoformen auf die AR-Aktivität verglich, war nur das nukleär lokalisierte BAG-1L in der Lage, die AR-abhängige Transkription zu steigern (Knee *et al.*, 2001). BAG-1M, primär im Zytosol lokalisiert, förderte die Transaktivierung des AR nicht. In derselben Studie führte aber die erzwungene nukleäre Lokalisation von BAG-1M zu einer verstärkten AR-Aktivität. Lokalisationsstudien der BAG-1-Isoformen in unserem Zellsystem ergaben eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern für BAG-1M (Schmidt *et al.*, in Vorbereitung). Die Stimulierung des AR könnte somit durch die vergleichsweise größere Kern-Fraktion von BAG-1M in unserem System bewirkt werden.

b) BAG-1M inhibiert die MR-Aktivität

Der MR wurde zusätzlich in die Untersuchung mit einbezogen, da bisher kein Einfluss von BAG-1M festgestellt wurde (Schneikert *et al.*, 1999). Nach bisheriger Literaturlage unterscheidet BAG-1M zwischen MR und GR (Crocoll *et al.*, 2000). Diese Tatsache würde wiederum für die Relevanz von BAG-1M im Hinblick auf die MR/GR-Balance und somit für die Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen sprechen.

In unserem System erfolgte auf die zunehmende Überexpression von BAG-1M überraschenderweise eine Inhibition der MR-Aktivität. Mit steigenden Mengen BAG-1M-Plasmid-DNA wurde die Rezeptor-Aktivität des MR deutlich reduziert. BAG-1M_mut hatte mit denselben Plasmidmengen keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des MR. Eine Verstärkung der MR-abhängigen Transkription wurde nicht beobachtet. Ähnlich wie im

Fälle des GR hatte BAG-1M den stärksten inhibitorische Effekt bei subsaturierenden Hormonkonzentrationen (0,03 nM Fludro). In Anbetracht dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, warum der negative Einfluss von BAG-1M auf die MR-Funktion bisher nicht beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung könnte im verwendeten Hormon selbst oder in der verwendeten Hormonkonzentration liegen. Der deutlichste Effekt von BAG-1M auf den MR wurde mit sehr geringen Flutrokortisonkonzentrationen beobachtet. Laut Literaturangaben wurde der Einfluss von BAG-1M auf die MR-Aktivität in Anwesenheit von 100 nM Aldosteron untersucht (Schneikert *et al.*, 1999). Mit einer Aldosteron-Konzentration von 100 nM ist die Sättigung des MR jedoch längst erreicht (Daten nicht gezeigt).

c) *HspBP1 inhibiert die Aktivität des GR, MR und AR in Abhängigkeit von Hsc70/Hsp70*

In den funktionellen Analysen reduzierte HspBP1 anders als BAG-1M, konzentrationsabhängig die transkriptionelle Aktivität der drei untersuchten Rezeptoren, GR, MR und AR. HspBP1_mut hingegen wies keine, bis schwach inhibitorische Effekte auf die Rezeptor-Aktivitäten auf. Letzteres liegt vermutlich an der Restbindung von Hsc70/Hsp70. Anders als BAG-1M_mut bindet HspBP1_mut noch geringe Mengen Hsc70/Hsp70 und wirkt daher wahrscheinlich noch als NEF. Trotzdem wurde die Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit des inhibitorischen Einflusses von HspBP1 deutlich.

Ähnlich wie unter dem Einfluss von BAG-1M nimmt die inhibitorische Wirkung von HspBP1 auf die transkriptionelle Aktivität mit steigenden Hormonkonzentrationen ab. Anders ausgedrückt, damit die Rezeptoren in Anwesenheit von BAG-1M und HspBP1 die gleiche Aktivität wie in Gegenwart von HspBP1_mut oder BAG-1M_mut erreichen, sind höhere Hormonkonzentrationen nötig. Dies könnte bedeuten, dass HspBP1 und BAG-1M, neben den oben genannten Effekten, die Hormonbindungsaffinität der entsprechenden Rezeptoren herabsetzen.

d) Modellvorschlag zur Funktionsweise von BAG-1M und HspBP1: zwei Wege der Modulation der Substratbindung von Hsc70

Ein Weg, um die Ligandenbindungsaffinität von SR zu beeinflussen, führt über den zytosolischen Faltungszyklus. Am Beispiel der Hsc70/Hsp70-Hsp90-abhängigen Faltung von SR lassen sich auch unterschiedliche Einflüsse verschiedener Cofaktoren auf die entsprechenden Chaperone untersuchen. In Interaktionsexperimenten wurde überprüft, ob es Unterschiede im Interaktionsprofil zwischen BAG-1M und HspBP1 mit den Rezeptoren (GR, MR und AR) selbst oder faltungsrelevanten Cofaktoren gibt.

Es stellte sich heraus, dass GR, MR und AR, Hsc70/Hsp70-abhängig schwächer an HspBP1 gebunden haben als an BAG-1M. Dies deutet darauf hin, dass HspBP1 einen negativen Einfluss auf die Substratbindung von Hsc70/Hsp70 besitzt. Unterstützt wurde diese Hypothese dadurch, dass in Gegenwart von HspBP1, im Gegensatz zu BAG-1M, kein Hsp40 präzipitiert wurde. Da Hsp40 zu frühen Zeitpunkten der Rezeptor-Faltung auftritt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass HspBP1 und BAG-1M die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 zu unterschiedlichen Zeiten im Verlauf der Rezeptor-Faltung beeinflussen.

Basierend auf den hier erläuterten Resultaten und den vorhandenen Literaturangaben wurde das in Abbildung 45 dargestellte Modell für den Wirkmechanismus von HspBP1 auf die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 in der SR-Faltung entwickelt.

Die Hypothese dieses Modells für den inhibitorischen Mechanismus von HspBP1 ist die Konkurrenz zwischen HspBP1 und Hsp40 um die Bindung an Hsc70. Diese Hypothese wird weiter durch die Beobachtung unterstützt, dass Hsp40 alleine nicht in der Lage ist, den Komplex HspBP1-Hsp70 zu dissoziieren, sondern dafür die Kooperation eines weiteren Cofaktors nötig ist (Oh & Song, 2003).

Dieses Modell würde ein „allgemeines“ Wirk-Prinzip von HspBP1 auf die Chaperon-Aktivität von Hsc70/Hsp70 zulassen. Als Folge davon werden die SR-Faltung und letztendlich auch die SR-Funktion beeinträchtigt. Es ist anzunehmen, dass nicht vollständig gefaltete Substrate entweder abgebaut werden, oder erneut in den Faltungszyklus eintreten. Dieses Modell bietet auch eine Erklärung für die in den Reporter-Experimenten beobachtete Reduktion der Hormonbindungsaffinität des GR, MR und AR in Anwesenheit von HspBP1.

Der Einfluss von BAG-1M auf die Hormonbindungsaffinität des GR wurde in dieser Arbeit mit dem von HspBP1 verglichen. Zusätzlich wurde die kinetische Komponente der Hsc70/Hsp70-Aktivität, die sich aus diesem Modell (Abb. 45) ergibt, am Beispiel der Hormonbindung des GR untersucht. Beide NEF müssten theoretisch einen ähnlichen Einfluss auf die zeitliche Abfolge des Faltungszyklus haben. Nimmt man jedoch an, dass bei der Überexpression von HspBP1 jedes Hsc70-Molekül von HspBP1 „abgebunden“ wird, würde die Hsp40-Bindung und die damit verbundene geförderte ATP-Hydrolyse von Hsc70 längerfristig gehemmt werden. Folglich würde die Substratbindung (Rezeptor-Bindung) über einen längeren Zeitraum beeinträchtigt werden.

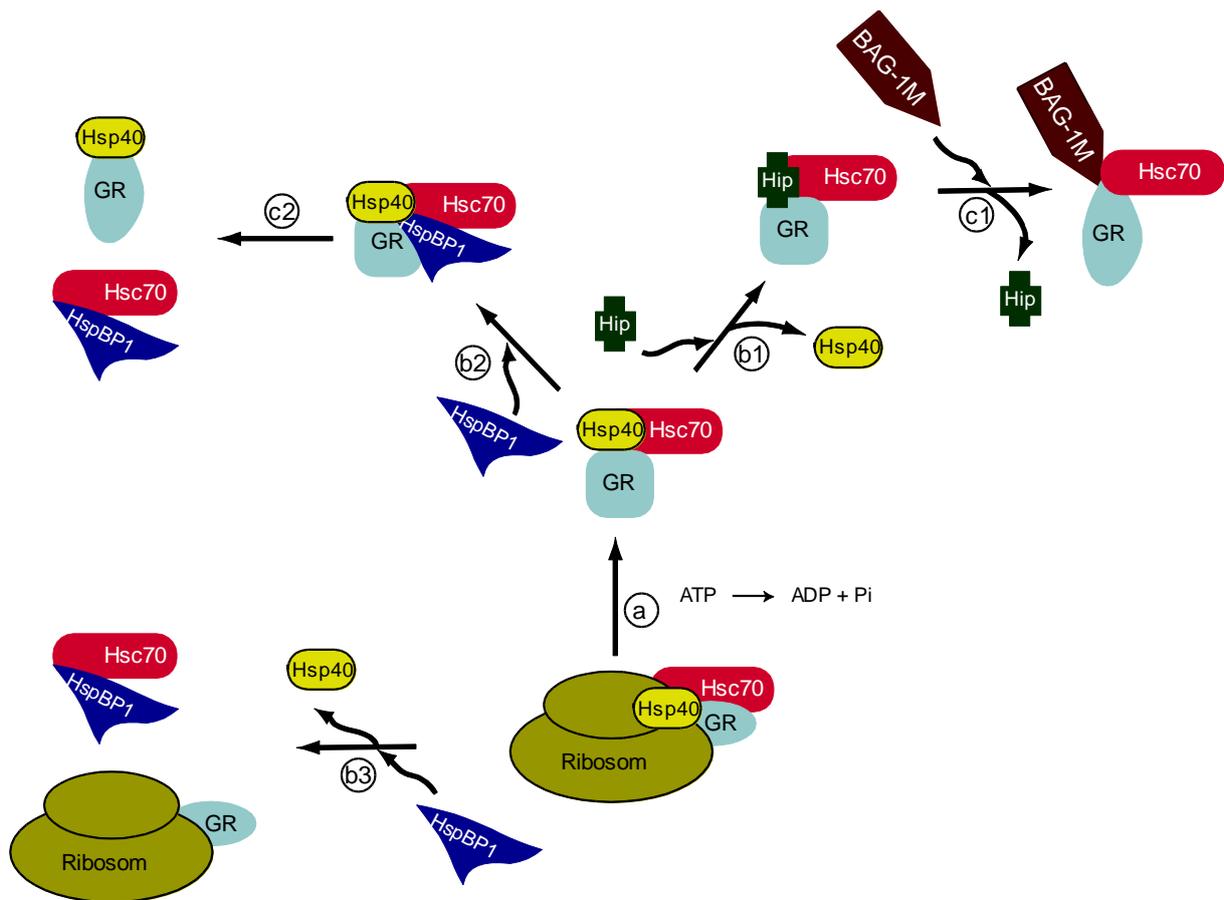


Abbildung 45: HspBP1 und BAG-1M inhibieren Hsc70/Hsp70 in unterschiedlichen Stadien in seiner Funktion als Chaperon der SR-Faltung. (a) Während der Translation am Ribosom wird das Substrat (GR) zuerst von Hsp40 gebunden und anschließend an Hsc70 übergeben (Laufen *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2002). Zeitgleich zur Übergabe des Substrats (GR) an Hsc70 fördert Hsp40 die ATP-Hydrolyse durch Hsc70, die eine starke Bindung des Klienten (GR) bewirkt (Russell *et al.*, 1999a). **(b1)** Hip tritt in den Zyklus ein und stabilisiert den Hsc70-Substrat-Komplex (Höhfeld *et al.*, 1995). **(c1)** BAG-1M konkurriert mit Hip um die Bindung an Hsc70 (Gebauer *et al.*, 1997). Zusätzlich entkoppelt BAG-1M die ATP-Hydrolyse durch Hsc70. Dies führt zur Freisetzung des unvollständig gefalteten Substrats, welches mit Hsc70 und BAG-1M einen Komplex bildet (Bimston *et al.*, 1998). **(b2, b3)** HspBP1 besitzt eine deutlich höhere Affinität für Hsc70 als Hsp40 (Oh & Song, 2003) und könnte die Bindung von Hsp40 an Hsc70 dissoziieren oder ganz verhindern. Eine Überexpression von HspBP1 würde die Hsp40-abhängige ATP-Hydrolyse durch Hsc70/Hsp70 und somit die Substratbindung verhindern. Dies könnte entweder nach der Ablösung vom Ribosom **(b2)** oder am Ribosom selbst (Dragovic *et al.*, 2006b) **(b3)** geschehen. Eine Auswirkung wäre die beobachtete reduzierte Bindung des GR, MR und AR an Hsc70-HspBP1 **(c2)**, verglichen mit Hsc70-BAG-1M **(c1)**. Darüber hinaus stimuliert HspBP1 ähnlich wie BAG-1 die Freisetzung nicht-nativer Substrate von Hsp70 (Shomura *et al.*, 2005). Hsc70 ist stellvertretend für Hsc70 und Hsp70 abgebildet.

Dies könnte sich auch differenziell auf den zeitlichen Ablauf der GR-Faltung in Anwesenheit von BAG-1M oder HspBP1 auswirken.

Es stellte sich heraus, dass die Coexpression von BAG-1M und GR in Abwesenheit von Hormon zu einer stark reduzierten GR-Expression führt. Wie bereits erwähnt (vgl. 5.1.2) ist dieser Effekt sehr wahrscheinlich auf den BAG-1-induzierten Abbau des GR (Demand *et*

al., 2001) zurückzuführen. Unter diesen Umständen konnte weder der Einfluss von BAG-1M auf die Ligandenbindungsaffinität des GR noch auf die Kinetik der GR-Faltung eindeutig ermittelt werden. Da in diesen Experimenten mit dem Zellextrakt unbehandelter Zellen gearbeitet wurde, ist anzunehmen, dass der GR in Gegenwart von BAG-1M durch Hormon stabilisiert wird, oder, dass BAG-1M den Liganden-gebundenen GR vor dem Abbau schützt. Diese Annahme wird durch die Expressionsanalysen der funktionellen Experimente unterstützt. Nach Hormonbehandlung zeigte BAG-1M keinen Einfluss auf das Expressionsniveau des GR.

Der Einfluss von FKBP51, das aufgrund seines bekannten inhibitorischen Effekts auf den GR in diese Untersuchung mit eingeschlossen wurde, auf die Hormonbindungsaffinität konnte bestätigt werden. Am deutlichsten war der Effekt in den Messungen der Bindungskinetik zu beobachten. HspBP1 hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Hormonbindungsaffinität des GR, verzögerte aber die Einstellung des Bindungsgleichgewichtes. Somit scheint HspBP1 die kinetischen Eigenschaften der Hormonbindungsreaktion zu modulieren.

Im Fluoreszenz-Polarisationsexperiment war ein Vergleich von HspBP1 und BAG-1M nicht möglich, da gleiche GR-Mengen nicht gewährleistet werden konnten. Besonders die Kinetik der Hormonbindung ist in diesen Versuchen sehr empfindlich gegenüber variablen Rezeptormengen. Kleinste Unterschiede können zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Um detaillierte Einblicke in die zeitliche Regulation von HspBP1 und BAG-1M auf die Hsc70/Hsp70-Aktivität zu gewinnen, empfiehlt sich die Wiederholung dieser Experimente mit gereinigten Proteinen. Nicht nur der Einfluss von HspBP1 und BAG-1M kann konzentrationsabhängig bestimmt werden, sondern es können auch konkrete Angaben über die effektivsten Konzentrationen gemacht werden. Da die Reinigung von SR als Volllängenprotein schwierig ist, und sich diese gereinigten Proteine teilweise anders verhalten als im Zellextrakt beobachtet (Dr. Christian Kozany, persönliche Kommunikation), ist in diesem Falle eine Überexpression im Zellextrakt vorzuziehen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass BAG-1M und HspBP1 auf unterschiedliche Weise die Hsc70/Hsp70-Aktivität beeinflussen und folglich auch die SR-Funktion. Im Gegensatz zu BAG-1M, das zusammen mit den anderen BAG-1-Isoformen auf verschiedenen Ebenen die Signaltransduktion von SR moduliert, scheint HspBP1 nach einem „allgemeinen“ Prinzip, das möglicherweise auf alle SR zutrifft, zu agieren. Da die richtige Faltung essentiell für die SR-Funktion ist, hat ein inhibitorischer Einfluss auf den Faltungszyklus, gleich zu welchem Zeitpunkt, drastische Folgen für die SR-Signaltransduktion.

Ob HspBP1 auch physiologisch eine Rolle für die SR-Signaltransduktion spielt, bedarf weiterer eingehender Studien. Bisher konnten die endogenen HspBP1-Spiegel in unserem Zellsystem aufgrund der schlechten Antikörperqualität nicht detektiert werden. Es ist nicht bekannt, ob Stress zu einer Überexpression von HspBP1, in z.B. neuronalen Zellen führt. Das

Gleiche gilt für BAG-1. Bisher gibt es keine Studien, inwieweit BAG-1 in Hirngewebe durch Glukokortikoide reguliert wird.

5.1.4 Alles eine Frage der Zeit?

Im Zusammenhang mit kinetischen Messungen wird manchmal die Frage nach der biologischen Relevanz gestellt. Da adaptive Prozesse zu den wichtigsten Überlebensstrategien von Zellen und Organismen gehören, ist eine ausgeprägte Feinmodulation nötig. Es ist essentiell, sich schnell und kontrolliert an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Aus diesem Grund ist es nicht nur wichtig, dass kompensatorische Prozesse ablaufen, sondern auch, wann dies geschieht. So wurde z. B. mittels Microarray Analysen der RNA-Expression festgestellt, dass die GR-abhängige Transkription durch Dexamethason, einen selektiven GR-Agonist, zeitabhängig unterschiedliche Verläufe aufweist. So stiegen die RNA-Spiegel mancher Gene sehr rasch nach der GR-Aktivierung, andere wiederum zeigten einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit (John *et al.*, 2009).

Maßgeblich für die Wirkung des GR als Transkriptionsfaktor ist auch sein Transport in den Zellkern. Laut Literatur ist die Mobilität des nukleären Transportes von den Liganden und der Ligandenaffinität abhängig (Schaaf & Cidlowski, 2003). Dieser Studie zufolge beeinflusst die Affinität für verschiedene Liganden das Translokationsverhalten des Rezeptors, indem sie eine Konformationsänderung im Rezeptor verursacht. Daher können Cofaktoren auch durch eine Veränderung der Hormonbindungsaffinität des Rezeptors die Translokationsrate des Rezeptors beeinflussen. Durch die ligandeninduzierten Konformationsänderungen ändert sich wahrscheinlich das Interaktionsprofil des Rezeptors für verschiedene Cofaktoren. Die so modulierte Interaktion mit transportrelevanten Proteinen wie z.B. Dynein hätte wiederum Einfluss auf die Translokationsrate. Ähnliches konnte bereits für den MR gezeigt werden (Gallo *et al.*, 2007). Diese Faktoren modulieren den nukleären Transport, und somit auch die Zeitspanne bis ausreichend GR in den Zellkern gelangt, um die Transkription entsprechender Gene zu aktivieren.

Die Signaltransduktion des GR wird nicht nur durch die Kinetik des Kerntransportes, sondern auch durch die zeitliche Dynamik regulatorischer Prozesse im Kern beeinflusst. Neben dem Ligand induziert die DNA-Sequenz selbst strukturelle Veränderungen im GR. Bereits der Unterschied von einem Nukleotid kann zu einer Wandlung der Struktur wie auch der regulatorischen Aktivität führen (Meijsing *et al.*, 2009). Lange Zeit glaubte man, der GR bliebe dauerhaft an die DNA gebunden, solange sich Hormon in der Zelle befindet (Becker *et al.*, 1984). Inzwischen ist bekannt, dass die Interaktion des GR mit seinen Zielsequenzen ein sehr dynamischer Prozess ist (McNally *et al.*, 2000). Der kontinuierliche Wechsel zwischen DNA-gebundenem und nicht gebundenem Rezeptor ermöglicht der Zelle eine schnelle Anpassung der GR-Aktivität. Ist der Rezeptor nicht an die DNA gebunden, ist er vermutlich leichter zugänglich für regulatorische Modifikationen. So wird die transkriptionelle Aktivität

je nach Bedarf durch z.B. Phosphorylierung des GR oder anderer transkriptioneller Komponenten moduliert, da das Interaktionsspektrum für bestimmte Cofaktoren verändert wird. Die Dissoziation des GR wird unter anderem von Chaperonen und Cochaperonen reguliert (Freeman & Yamamoto, 2002; Hong *et al.*, 2008). Auch am regulierten Abbau von Transkriptionskomponenten, der essentiell für eine kontinuierliche transkriptionelle Modulation ist, sind Chaperone und das Proteasom beteiligt. Wird ein Faktor im falschen zeitlich-räumlichen Kontext exprimiert, zieht dies Konsequenzen für den transkriptionellen Ablauf nach sich. All diese Prozesse für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase oder ihrer Wiederherstellung nach Stress sind einer fein abgestimmten zeitlichen Reihenfolge unterworfen. Verzögerungen während der Faltung, dem Transport, der DNA-Bindung oder Dissoziation etc., können die Präzision dieses zellulären „Uhrwerks“ empfindlich stören und weitreichende Folgen haben. In diesem Sinne können kinetische Messungen Chaperon-abhängiger Prozesse Einblicke über die temporäre Regulation bestimmter Abschnitte der Signaltransduktion von SR geben.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass zwischen HspBP1 und BAG-1M ein mechanistischer Unterschied in ihrer Wirkung auf SR besteht. Basierend auf ihrem differenziellen Einfluss auf Hsc70/Hsp70, wirken HspBP1 und BAG-1M ähnlich, aber teils auch gegensätzlich auf die Aktivität von SR. Anders als BAG-1M scheint HspBP1 dies ausschließlich über Hsc70/Hsp70 zu bewirken. Davon ist auch die zeitliche Abfolge Hsc70/Hsp70-koordinierter Prozesse betroffen. Im Gegensatz dazu moduliert BAG-1M, aufgrund seines breiteren Interaktionsspektrums (Hsc70/Hsp70, Rpt6 etc.), die Signaltransduktion von SR auf verschiedenen Ebenen. In jedem Fall besitzt HspBP1, ebenso wie BAG-1M, das Potenzial, den in depressiven Patienten beobachteten Hyperkortisolismus zu verursachen und zu fördern.

5.2 Modulation der Steroidhormonrezeptor-Aktivität durch gezielte Modifikationen der MR-LBD

Der letzte Abschnitt dieser Arbeit befasste sich mit der Modulation der SR-Aktivität durch Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des SR selbst. Durch gezielte Substitution der gesamten LBD oder einzelner Aminosäuren wurde die Glukokortikoid-Affinität des mMR an die des mGR angeglichen. Die auf diese Weise generierten mMR-Mutanten waren die Vorarbeit für die Herstellung eines transgenen Tiermodells. Dieses Tiermodell dient der Überprüfung der Hypothese, dass das Gleichgewicht zwischen MR und GR ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung der basalen Selbstregulation und den Umgang mit Stress ist. Unter stressfreien Bedingungen ist aufgrund seiner hohen Glukokortikoid-Affinität der MR aktiv. Durch erhöhte Kortisolspiegel unter Stress ist es primär der GR, dessen Aktivität für adaptive Prozesse mitverantwortlich ist. Es hat sich jedoch gezeigt, dass chronischer Stress, und damit verbunden chronisch erhöhte Kortisolspiegel, pathophysiologische Auswirkungen haben, und auch mit der Entwicklung depressiver Störungen assoziiert sind (Holsboer, 2000; Young, 2006). Unter diesen hyperkortisolen Bedingungen ist das Gleichgewicht in Richtung GR-Aktivität verschoben. Im angestrebten Tiermodell soll die ektopische Expression der hier klonierten mMR-Mutanten dazu führen, dass unter Stress ein MR aktiviert wird, der die Balance zwischen MR- und GR-Aktivität wiederherstellt.

5.2.1 Veränderung der Hormonbindungsaffinität des mMR durch Substitution und Mutationen der LBD

Für die Herstellung eines mMR mit der Kortikosteron-Affinität des mGR wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt. Basierend auf strukturellen Unterschieden zwischen den LBDs von GR und MR wurde eine MR-GR-Chimäre (mCH) kloniert, deren mMR-LBD durch die mGR-LBD ersetzt wurde. In Anlehnung an die bereits existierenden Kristallstrukturen des hGR (Bledsoe *et al.*, 2002; pdb: 1M2Z) und hMR (Bledsoe *et al.*, 2005; pdb: 2AA2) wurden verschiedene MR-Mutanten hergestellt, die Mutationen in der mMR-LBD tragen. Diese Mutationen sollten einerseits zu einer lokalen Korrektur der Hormonbindungstasche führen, andererseits zur Verschiebung der bindungsrelevanten Helix 7 im MR. Auf diese Weise wurde angestrebt, die Position von Helix 7 im mMR strukturell an die der homologen Helix 5 im hGR anzupassen.

Die Mutation S811G sollte die Re-Positionierung der Helix7 in der mMR-LBD bewirken, um sie an die Struktur der hGR-LBD anzugleichen.

Die lokale Korrektur erfolgte durch den Austausch von Q772E und M848I. Diese Mutationen sollten die Bindung von Mineralokortikoiden, den bevorzugten Liganden des mMR, schwächen (Q772E) und Raum schaffen, für die Re-Positionierung (M848I) von H7.

Im funktionellen Vergleich besaß sowohl die MR-GR-Chimäre (mCH) als auch eine MR-Mutante, die beide Mutationen (S811G/M848I, mGI) trägt, eine mGR-ähnliche Responsivität auf Kortikosteron (Tab. 9). Allerdings variierten die Konzentrationen, die zu einer Aktivität von 50% führten, zelltypabhängig. Beide MR-Mutanten respondierten bei deutlich höheren Konzentrationen als der Wildtyp mMR, jedoch teilweise bei etwas niedrigeren Kortikosteronkonzentrationen als der Wildtyp mGR.

Tabelle 9: Kortikosteronresponsivität im Vergleich

Rezeptor	mMR		mGR		mCH		mGI	
Zelllinie	SK	N2A	SK	N2A	SK	N2A	SK	N2A
Kort. [nM]	basal	basal	3-10	3-10	10-20	1-3	1-3	0,1-1

Kortikosteronkonzentration (Kort) in nM, bei der mMR, MGR, mCH und mGI 50% ihrer Aktivität erreichten. Die Abkürzungen SK und N2A bezeichnen die verwendeten Zelllinien SK-N-MC und Neuro-2A.

In den Zelllinien SK-N-MC und N2a erreichte der mMR bereits unter basalen Bedingungen 50% seiner maximalen Aktivität. Dies ist sehr wahrscheinlich auf einen bisher unbekanntem Liganden in dem für die Medien-Herstellung verwendeten steroidfreien FBS zurückzuführen.

In einer Masterarbeit wurden beide MR-Mutanten noch genauer bezüglich ihrer Responsivität auf Kortikosteron, Aldosteron und Dexamethason, wie auch ihrer Bindungsaffinität für Kortikosteron, charakterisiert und mit den Wildtyp-Rezeptoren verglichen (Weidinger, 2009).

Beide Mutanten erreichten mit deutlich höheren Kortikosteronkonzentrationen als der Wildtyp MR 50% ihrer maximalen Aktivität. In der Hormonbindungsstudie wurde für den mMR eine K_D von 1,44 nM und für den mGR eine K_D von 11,54 nM bestimmt. Der Unterschied zwischen der Ligandenaffinität des GR und MR stimmt mit Literaturangaben zu den murinen Rezeptoren überein (Rozeboom *et al.*, 2007). Mit einer berechneten K_D von 10,93 besaß die MR-GR-Chimäre eine vergleichbare Kortikosteron-Affinität wie der mGR. Die K_D der MR-Punktmutante lag mit 3,09 nM näher am MR als die Responsivität in Reporter-Experimenten vermuten ließ. Dasselbe galt auch für die berechnete K_D des MR. Basierend auf den funktionellen Analysen hätte man eine deutlich geringere K_D (< 1 nM) für den mMR erwartet. Da die Ligandenaffinität das Translokationsverhalten von SR beeinflusst (Schaaf & Cidlowski, 2003), und dadurch ihre transkriptionelle Aktivität, wäre dies eine denkbare Erklärung, für den Widerspruch in der Responsivität und der gemessenen K_D der mMR_GI-Mutante. Die mutierten Reste und die damit einhergehende strukturelle Änderung

der mMR-LBD könnten sich auf die nukleäre Translokation auswirken. Allerdings ist nicht sicher, dass sich eine Variation in der Transportrate des Rezeptors über den experimentellen Zeitraum bemerkbar macht. Der Widerspruch bezüglich der beobachteten Responsivität und der gemessenen K_D des mMR-Wildtyps kann vermutlich auf den Unterschied in der experimentellen Methode, lebende Zellen versus Zellextrakt zurückgeführt werden. Intrazellulär wird die Rezeptor-Aktivität von verschiedenen Cofaktoren und auch der DNA selbst reguliert (Meijsing *et al.*, 2009). Im *in vitro*-System ist es schwierig, die Versuchsbedingungen vollständig an alle zellulären Parameter anzupassen.

Wie sich beide mMR-Mutanten im Tiermodell verhalten, muss noch untersucht werden. Bei diesem Tiermodell handelt es sich um eine ektopische Überexpression der Flag-MR-Mutanten, die durch den Promotor der Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) angetrieben wird. Dies führt zu einer postnatalen Expression der MR-Mutanten im Vorderhirn (Neocortex, Striatum, Hippocampus und Amygdala) (Minichiello *et al.*, 1999). Für beide MR-Mutanten wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, die endogenen mGR und mMR exprimieren. Dieses Tiermodell wurde mit der Absicht kreiert, unter basalen Bedingungen sowohl im Verhalten als auch auf genregulatorischer Ebene das Wildtyp-Niveau zu erhalten, und erst unter Stress das Signal auf einen modifizierten mMR umzuleiten. Die erwartete Konsequenz ist eine Wiederherstellung der MR-GR-Balance unter Stress.

5.2.2 Ein neuer Ansatz zur Überprüfung der Relevanz der MR/GR-Balance für die Stressbewältigung

Lange galt als traditionelles Konzept für die Ätiologie depressiver Erkrankungen die Monoaminhypothese. Während der letzten Jahre jedoch wurde es offensichtlich, dass neben einer Monoamindefizienz und einem Ungleichgewicht anderer Neurotransmittersysteme weitere Faktoren für die Veränderung in der Neuroplastizität und neuronalen Architektur eine Rolle spielen. Eine Beobachtung aus Klinik und Präklinik diesbezüglich ist die signifikante Reduktion des Hippocampusvolumen bei depressiven Patienten. Die möglichen Ursachen für dieses Phänomen werden kontrovers diskutiert, da häufig unterschiedliche Beobachtungen in Tiermodellen und bei der Untersuchung depressiver Patienten (u. a. post mortem) gemacht werden (Czeh & Lucassen, 2007).

Viele dieser Veränderungen der neuronalen Architektur wurden nach chronischem Stress oder nach Belastung mit Glukokortikoiden, wie auch bei einer Hyperaktivität der HPA-Achse bei manchen depressiven Erkrankungen, festgestellt (Woolley *et al.*, 1990; Bowley *et al.*, 2002). Teilweise konnten sie durch die Behandlung mit Antidepressiva oder Glukokortikoid-Antagonisten korrigiert werden (Malberg & Schechter, 2005; Oomen *et al.*, 2007).

Die Relevanz des MR für die Regulation der Kortikosteron-Ausschüttung oder die Überlebensrate von Neuronen (Macleod *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2009), wie auch der damit

verbundene Einfluss auf Verhaltensparameter, wurde mehrfach beschrieben. So führt die Überexpression des mMR im Vorderhirn zu einer Reduktion eines Angst-ähnlichen Verhaltens, sowie zu einer veränderte Stressantwort (Rozeboom *et al.*, 2007). In Ratten führt die MR-Überexpression unter basalen Bedingungen oder Stress zu verminderter Angst (Mitra *et al.*, 2009). In Mäusen, in denen das für MR kodierende Gen inaktiviert wurde, erwies sich die MR-Funktion wichtig für die Kontrolle der emotionalen Erregbarkeit und für das adaptive Verhalten auf Angst (Brinks *et al.*, 2009). In all diesen Tiermodellen ist das Gleichgewicht zwischen MR und GR schon unter basalen Bedingungen in Richtung der MR- oder GR-Funktionen verschoben.

Hier bietet das angestrebte Tiermodell einen stressrelevanteren Ansatz für die Untersuchung zur Bedeutung der MR/GR-Balance. Im Gegensatz zu den bisherigen Tiermodellen wird die MR-Manipulation erst bei erhöhten Kortikosteronspiegeln relevant, also genau in den Situationen (Stress), in denen zusätzlich MR benötigt wird.

Als Stressmodell ermöglichen diese transgenen Tiere die Untersuchung der beobachteten neuroprotektiven Effekte des MR und der neurodegenerativen Wirkung des GR nach Stress auf zellulärer Ebene. Auch wenn die Studien zwischen depressiven Patienten und Tiermodellen bisher unterschiedliche Ergebnisse lieferten, trägt die Untersuchung neurodegenerativer oder regenerierender Prozesse nach chronischem Stress in diesem Modell zur Klärung der bisher im Tier beobachteten Veränderungen bei. Verhaltenstest bezüglich der Stress-Reaktivität oder des Angstverhaltens können über die Relevanz der MR/GR-Balance für emotionale Parameter Klarheit schaffen. Genexpressionsanalysen können zu einem besseren Verständnis der Regulation für adaptive und kompensatorische Prozesse führen. Das Studium dieser Tiere über die Lebensspanne hinweg kann Aufschluss darüber geben, inwieweit das Gleichgewicht von GR und MR im Gehirn zur neuronalen Plastizität beiträgt und somit die kognitiven Fähigkeiten beeinflusst.

Neben den eben beschriebenen Parametern ist die dauerhafte Aktivierung des GR ebenso ein Risikofaktor für metabolische Erkrankungen wie Typ II Diabetes oder Gefäßerkrankungen. Zusammengefasst werden die metabolischen Veränderungen unter dem Begriff metabolisches Syndrom (Anagnostis *et al.*, 2009).

Dieses Tiermodell, in dem durch einen modifizierten mMR unter Stress das Gleichgewicht zwischen MR und GR wiederhergestellt werden soll, bietet in vielerlei Hinsicht einen neuen Ansatz, um Einblicke in die Regulation und Modulation adaptiver Prozesse, struktureller Veränderungen der neuronalen Architektur wie auch veränderter kognitiver Fähigkeiten und emotionaler Parameter zu gewinnen. Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie und –biologie leisten, wie sie nicht nur bei depressiven, sondern auch bei anderen psychiatrischen Erkrankungen stressbedingt auftreten.

6 Zusammenfassung

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Pathogenese einer depressiven Störung beitragen, ist Voraussetzung für die Verbesserung der therapeutischen Behandlungsstrategien. Die häufig beobachteten erhöhten Kortisolspiegel, sowie eine veränderte Reaktion im kombinierten Dex-CRH-Test von depressiven Patienten, deuten auf eine mögliche Beeinträchtigung der Funktion der Kortikosteroidrezeptoren (GR, MR) hin. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Modulation der SR-Aktivität durch die Cochaperone BAG-1M und HspBP1 untersucht. Zum anderen wurde die Ligandenaffinität des MR durch gezielte Modifikationen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) verändert und funktionell analysiert.

Im Gegensatz zu HspBP1 ist BAG-1 ein bereits beschriebener Modulator der Funktion verschiedener SR, mit Ausnahme des Progesteronrezeptors (PR). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BAG-1M, ein GR-Inhibitor, ähnliche inhibitorische Effekte auf die transkriptionelle Aktivität des PR ausübte. Die scheinbar Hsc70/Hsp70-unabhängige Reduktion der PR-Aktivität in Reporter-gen-Experimenten, sowie die Interaktionsanalyse verschiedener PR-Mutanten mit BAG-1M mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten, weisen darauf hin, dass der PR-Inhibition durch BAG-1M ein zum GR unterschiedlicher Mechanismus zu Grunde liegt.

In einer vergleichenden Studie über die Wirkung von HspBP1 und BAG-1M auf die transkriptionelle Aktivität des GR, MR und AR wurde ein funktioneller und mechanistischer Unterschied zwischen den beiden Hsc70/Hsp70-NEF festgestellt. Anders als BAG-1M führte HspBP1 in den funktionellen Analysen bei allen drei Rezeptoren zur Reduktion der Transaktivierung des Reportergens. Für BAG-1M wurde erstmals ein inhibitorischer Effekt auf die MR-Aktivität gezeigt. Darüber hinaus verstärkte BAG-1M in geringen Konzentrationen die transkriptionelle Aktivität des GR und AR. Im Falle des AR wurde eine deutliche Hsc70/Hsp70-Abhängigkeit der Rezeptor-Stimulierung beobachtet.

In weiterführenden Co-Immunpräzipitationsexperimenten stellte sich heraus, dass HspBP1 und BAG-1M die Zusammensetzung des Hsc70-Rezeptor-Heterokomplexes differentiell beeinflussen. In Gegenwart von HspBP1 konnte Hsp40 nicht im Chaperon-Rezeptor-Heterokomplex nachgewiesen werden. Damit einhergehend wurde eine Reduktion der Hsc70/Hsp70-abhängigen Rezeptor-Bindung beobachtet. Im Gegensatz dazu lag Hsp40 als Teil des durch BAG-1M copräzipitierten Chaperon-Rezeptor-Heterokomplexes vor. Zusätzlich war die Hsc70/Hsp70-vermittelte Rezeptor-Assoziation mit BAG-1M vergleichsweise stärker.

Basierend auf diesen Befunden wurde die Hypothese entwickelt, dass HspBP1 die Hsp40-Bindung an Hsc70/Hsp70 verhindert. Die daraus resultierende Inhibition der Hsp40-abhängigen ATP-Hydrolyse durch Hsc70/Hsp70 ist in Übereinstimmung mit der verminderten Bindung von Hsc70 an seine Substrate GR, MR und AR. Dieses Modell führte

zu der Annahme, dass beide Proteine die Hsc70/Hsp70-Chaperon-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten beeinflussen. Tatsächlich wurde in Polarisationsexperimenten ein Einfluss von HspBP1 auf die zeitliche Abfolge der Hsc70/Hsp70-assistierten GR-Faltung festgestellt. Da die Coexpression von BAG-1M und GR in diesen Experimenten eine Reduktion der Proteinmenge des ligandenfreien Rezeptors zur Folge hatte, konnte der Einfluss von BAG-1M auf die GR-Faltung nicht analysiert werden. Überraschenderweise war die Reduktion der Rezeptor-Expression nur in Abwesenheit des Hormons zu beobachten. Unter Verwendung von BAG-1M_Ubidel sollte überprüft werden, ob der BAG-1M-vermittelte proteasomale Abbau ursächlich für die Reduktion der Rezeptor-Aktivität verantwortlich ist. Die Deletion der UL-Domäne hat bekanntermaßen den Verlust der Interaktion von BAG-1M mit dem Proteasom zur Folge. Der verstärkte inhibitorische Effekt von BAG-1M_Ubidel auf die GR- und MR-Transaktivierung legte nahe, dass die reduzierte Rezeptor-Aktivität durch Wildtyp BAG-1M nicht auf den BAG-1M-vermittelten proteasomalen Abbau der Rezeptoren zurückgeführt werden kann. Durch Anreicherung von BAG-1M-assoziierten Proteinen mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse wurden erstmalig zwei neue, von Hsc70/Hsp70 unabhängige Interaktionspartner, Rpt4 und Rpt6, identifiziert, die ebenfalls Teil des 26S-Proteasoms sind. Diese Daten lassen vermuten, dass neben der Interaktion mit Hsc70/Hsp70 die Rekrutierung proteasomaler Untereinheiten eine weitere Möglichkeit zur Regulation der GR- und MR-abhängigen Transkription durch BAG-1 darstellt.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde am Beispiel des mMR eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Steroidhormonrezeptor-Aktivität untersucht. Durch gezielte Modifikationen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des mMR wurde die Kortikosteron-Affinität des mMR herabgesetzt. Die Substitution der mMR-LBD durch die LBD des mGR einerseits und die Mutationen S811G/M848I in den ligandenbindungsrelevanten Helices andererseits, führten zu einer mGR-ähnlichen Hormonresponsivität. In Reporter-gen-Analysen wurde gezeigt, dass beide mMR-Mutanten erst bei deutlich höheren Kortikosteronkonzentrationen transkriptionell aktiv wurden als mMR Wildtyp. Diese Mutationsanalysen bildeten die Vorarbeiten für ein transgenes Tiermodell. In diesen Mäusen sollte unter Stress die Kortikosteron-Antwort auf einen modifizierten MR umgeleitet werden, um das MR/GR-Gleichgewicht wiederherzustellen. Durch phänotypische Charakterisierung dieses Tiermodells erhofft man sich neue Erkenntnisse, über die Bedeutung des MR/GR-Gleichgewichts für die Auswirkungen von Stress auf das Verhalten und emotionale Parameter zu gewinnen.

Zusammenfassend lieferte diese Studie neue Einblicke in die Chaperon-abhängige Regulation von SR und trägt zur Identifizierung potentieller Einflussfaktoren der HPA-Achsen-Aktivität bei.

7 Literaturverzeichnis

- Ahima R, Krozowski Z, & Harlan R (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* **313**, 522-538.
- Alberti S, Bohse K, Arndt V, Schmitz A, & Hohfeld J (2004). The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 4003-4010.
- Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild HR, & Hohfeld J (2003a). Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome (vol 277, pg 45920, 2002). *Journal of Biological Chemistry* **278**, 18702-18703.
- Alberti S, Esser C, & Hohfeld J (2003b). BAG-1 - A nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress & Chaperones* **8**, 225-231.
- Almlöf T, Wallberg AE, Gustafsson JA, & Wright AP (1998). Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors
1941. *Biochemistry* **37**, 9586-9594.
- Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, & Mikhailidis DP (2009). The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**, 2692-2701.
- Archer TK, Deroo BJ, & Fryer CJ (1997). Chromatin modulation of glucocorticoid and progesterone receptor activity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **8**, 384-390.
- Bardeleben U & Holsboer F (1989). Cortisol response to a combined dexamethasone-human corticotrophin-releasing hormone challenge in patients with depression. *J Neuroendocrinol* **1**, 485-488.
- Bardelli A, Longati P, Albero D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, & Comoglio PM (1996). HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death
519. *EMBO J* **15**, 6205-6212.
- Barnes PJ (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* **94**, 557-572.
- Barnes PJ & Adcock IM (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* **373**, 1905-1917.
- Becker P, Renkawitz R, & Schutz G (1984). Tissue-Specific Dnase I Hypersensitive Sites in the 5'-Flanking Sequences of the Tryptophan Oxygenase and the Tyrosine Aminotransferase Genes. *Embo Journal* **3**, 2015-2020.
- Beggah AT, Escoubet B, Puttini S, Cailmail S, Delage V, Ouvrard-Pascaud A, Bocchi B, Peuchmaur M, Delcayre C, Farman N, & Jaisser F (2002). Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7160-7165.

- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, & Schutz G (1998). Mineralocorticoid receptor knockout mice: Pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9424-9429.
- Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, & Morimoto RI (1998). BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release
526. *EMBO J* **17**, 6871-6878.
- Bledsoe RK, Madauss KP, Holt JA, Apolito CJ, Lambert MH, Pearce KH, Stanley TB, Stewart EL, Trump RP, Willson TM, & Williams SP (2005). A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 31283-31293.
- Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, Mckee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, & Xu HE (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **110**, 93-105.
- Board F, Wadeson R, & Persky H (1957). Depressive Affect and Endocrine Functions - Blood Levels of Adrenal Cortex and Thyroid Hormones in Patients Suffering from Depressive Reactions. *Archives of Neurology and Psychiatry* **78**, 612-620.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, & Balow JE (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates
1950. *Ann Intern Med* **119**, 1198-1208.
- Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, & Price JL (2002). Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biological Psychiatry* **52**, 404-412.
- Brinks V, Berger S, Gass P, de Kloet ER, & Oitzl MS (2009). Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. *Hormones and Behavior* **56**, 232-238.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, & Nilsen J (2008). Progesterone receptors: Form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* **29**, 313-339.
- Burnstein KL, Jewell CM, Sar M, & Cidlowski JA (1994). Intragenic Sequences of the Human Glucocorticoid Receptor Complementary-Dna Mediate Hormone-Inducible Receptor Messenger-Rna Down-Regulation Through Multiple Mechanisms. *Molecular Endocrinology* **8**, 1764-1773.
- Butler PW & Besser GM (1968). Pituitary-adrenal function in severe depressive illness
2043. *Lancet* **1**, 1234-1236.
- Cadepond F, Gasc JM, Delahaye F, Jibard N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Evans R, & Baulieu EE (1992). Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor
2041. *Exp Cell Res* **201**, 99-108.
- Cairns C, Cairns W, & Okret S (1993). Inhibition of Gene-Expression by Steroid-Hormone Receptors Via A Negative Glucocorticoid Response Element - Evidence for the Involvement of Dna-Binding and Agonistic Effects of the Antiglucocorticoid Antiprogestin Ru486. *Dna and Cell Biology* **12**, 695-702.

- Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, vandeStolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, & vanderSaag PT (1995). Negative Cross-Talk Between Rel α and the Glucocorticoid Receptor - A Possible Mechanism for the Antiinflammatory Action of Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* **9**, 401-412.
- Carroll BJ, Martin FIR, & Davies B (1968). Resistance to Suppression by Dexamethasone of Plasma 11-OHcs Levels in Severe Depressive Illness. *British Medical Journal* **3**, 285-&.
- Carsonjura MA, Lee AT, Dobson AW, Conneely OM, Schrader WT, & Omalley BW (1989). Interaction of the Chicken Progesterone-Receptor with Heat-Shock Protein (Hsp)-90. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 1-9.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, & Baulieu EE (1990). Several Regions of Human Estrogen-Receptor Are Involved in the Formation of Receptor-Heat Shock Protein-90 Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 20686-20691.
- Chen SY & Smith DF (1998). Hsp70 as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 35194-35200.
- Chung KT, Shen Y, & Hendershot LM (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* **277**, 47557-47563.
- Clevenger CV, Thickman K, Ngo W, Chang WP, Takayama S, & Reed JC (1997). Role of Bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2. *Mol Endocrinol* **11**, 608-618.
- Coldwell MJ, deSchoolmeester ML, Fraser GA, Pickering BM, Packham G, & Willis AE (2001). The p36 isoform of BAG-1 is translated by internal ribosome entry following heat shock. *Oncogene* **20**, 4095-4100.
- Crocoll A, Schneikert J, Hubner S, Martin E, & Cato ACB (2000). BAG-1M: A potential specificity determinant of corticosteroid receptor action. *Kidney International* **57**, 1265-1269.
- Cutress RI, Townsend PA, Sharp A, Maison A, Wood L, Lee R, Brimmell M, Mullee MA, Johnson PWM, Royle GT, Bateman AC, & Packham G (2003). The nuclear BAG-1 isoform, BAG-1L, enhances oestrogen-dependent transcription. *Oncogene* **22**, 4973-4982.
- Czeh B & Lucassen PJ (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **257**, 250-260.
- Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, & Vreugdenhil E (2001). Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *European Journal of Neuroscience* **14**, 675-689.
- de Kloet ER & DeRijk R (2004). Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease - Genetic and kinetic factors affecting the MR/GR balance. *Biobehavioral Stress Response: Protective and Damaging Effects* **1032**, 14-34.
- de Kloet ER, Derijk RH, & Meijer OC (2007). Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 168-179.
- de Kloet ER, Oitzl MS, & Joels M (1993). Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol* **13**, 433-455.

- de Kloet ER, Reul JM, de Ronde FS, Bloemers M, & Ratka A (1986). Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J Steroid Biochem* **25**, 723-731.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, & Joels M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* **19**, 269-301.
- De Nicola AF, Ferrini M, Gonzalez SL, Deniselle MCG, Grillo CA, Piroli G, Saravia F, & de Kloet ER (1998). Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **65**, 253-272.
- Demand J, Alberti S, Patterson C, & Höhfeld J (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling 1515. *Curr Biol* **11**, 1569-1577.
- Dennis AP, Lonard DM, Nawaz Z, & O'Malley BW (2005). Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **94**, 337-346.
- Denny WB, Valentine DL, Reynolds PD, Smith DF, & Scammell JG (2000). Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology* **141**, 4107-4113.
- Deroo BJ & Archer TK (2002). Differential activation of the I kappa B alpha and mouse mammary tumor virus promoters by progesterone and glucocorticoid receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **81**, 309-317.
- Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, & Yamamoto KR (1990). Transcription Factor Interactions - Selectors of Positive Or Negative Regulation from A Single Dna Element. *Science* **249**, 1266-1272.
- Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, & Pratt WB (1998). The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor center dot hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90 center dot p60 center dot hsp70 foldosome complex. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7358-7366.
- Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, & Pratt WB (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery - The role of p23 is to stabilize receptor-hsp90 heterocomplexes formed by hsp90-p60-hsp70. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 21213-21220.
- Dobbyn HC, Hill K, Hamilton TL, Spriggs KA, Pickering BM, Coldwell MJ, de Moor CH, Bushell M, & Willis AE (2008). Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene* **27**, 1167-1174.
- Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, & Okret S (1988). Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol* **2**, 1256-1264.
- Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, & Hartl FU (2006a). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *Embo Journal* **25**, 2519-2528.
- Dragovic Z, Shomura Y, Tzvetkov N, Hartl FU, & Bracher A (2006b). Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biological Chemistry* **387**, 1593-1600.

- Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De LA, Nemer M, & Schmidt TJ (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* **12**, 145-156.
- Elliott E, Laufer O, & Ginzburg I (2009). BAG-1M is up-regulated in hippocampus of Alzheimer's disease patients and associates with tau and APP proteins. *J Neurochem* **109**, 1168-1178.
- Elliott E, Tsvetkov P, & Ginzburg I (2007). BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. *J Biol Chem* **282**, 37276-37284.
- Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, & Finley D (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* **4**, 725-730.
- Evans-Storms RB & Cidlowski JA (1995). Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 1-8.
- Fan MY, Nakshatri H, & Nephew KP (2004). Inhibiting proteasomal proteolysis sustains estrogen receptor-alpha activation. *Molecular Endocrinology* **18**, 2603-2615.
- Faus H & Haendler B (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**, 520-528.
- Ferdous A, Gonzalez F, Sun LP, Kodadek T, & Johnston SA (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Molecular Cell* **7**, 981-991.
- Ferdous A, Kodadek T, & Johnston SA (2002). A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry* **41**, 12798-12805.
- Freeman BC & Yamamoto KR (2002). Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* **296**, 2232-2235.
- Froesch BA, Takayama S, & Reed JC (1998). BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11660-11666.
- Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, & Pratt WB (2001). Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14884-14889.
- Galigniana MD, Scruggs JL, Herrington J, Welsh MJ, Carter-Su C, Housley PR, & Pratt WB (1998). Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Molecular Endocrinology* **12**, 1903-1913.
- Gallo LI, Ghini AA, Pilipuk GP, & Galigniana MD (2007). Differential recruitment of tetratricopeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity. *Biochemistry* **46**, 14044-14057.
- Gebauer M, Zeiner M, & Gehring U (1997). Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity 146. *FEBS Lett* **417**, 109-113.

- Gebauer M, Zeiner M, & Gehring U (1998). Interference between proteins Hap46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70 1147. *Mol Cell Biol* **18**, 6238-6244.
- Gehring U (2004). Biological activities of HAP46/BAG-1. The HAP46/BAG-1 protein: regulator of HSP70 chaperones, DNA-binding protein and stimulator of transcription 2374. *EMBO Rep* **5**, 148-153.
- Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FTF, Sigler PB, & Lifton RP (2000). Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* **289**, 119-123.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, & Laudet V (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 685-704.
- GIBBONS JL & McHUGH PR (1962). Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatr Res* **1**, 162-171.
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, & Evans RM (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor 322. *Cell* **46**, 645-652.
- Götz R, Wiese S, Takayama S, Camarero GC, Rossoll W, Schweizer U, Troppmair J, Jablonka S, Holtmann B, Reed JC, Rapp UR, & Sendtner M (2005). Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells 2537. *Nat Neurosci* **8**, 1169-1178.
- Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, & Camacho-Arroyo I (2002). Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin* **59**, 105-109.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Chavira R, & Camacho-Arroyo I (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *Journal of Neuroendocrinology* **15**, 984-990.
- Guzey M, Takayama S, & Reed JC (2000). BAG1L enhances trans-activation function of the vitamin D receptor. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 40749-40756.
- Harrell JM, Murphy PJM, Morishima Y, Chen HF, Mansfield JF, Galigniana MD, & Pratt WB (2004). Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 54647-54654.
- Harrison RJ, McNeil GP, & Dobner PR (1995). Synergistic activation of neurotensin/neuromedin N gene expression by c-Jun and glucocorticoids: novel effects of Fos family proteins. *Mol Endocrinol* **9**, 981-993.
- Hernandez MP, Chadli A, & Toft DO (2002). HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11873-11881.
- Heuser I & Lammers CH (2003). Stress and the brain 1910. *Neurobiol Aging* **24 Suppl 1**, 69-76.
- Heuser I, Yassouridis A, & Holsboer F (1994). The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders 1211. *J Psychiatr Res* **28**, 341-356.

- Hittelman AB, Burakov D, Iniguez-Lluhi JA, Freedman LP, & Garabedian MJ (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo Journal* **18**, 5380-5388.
- Höhfeld J & Jentsch S (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1 [published erratum appears in EMBO J 1998 Feb 2;17(3):847] 522. *EMBO J* **16**, 6209-6216.
- Höhfeld J, Minami Y, & Hartl FU (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle
21. *Cell* **83**, 589-598.
- Hollenberg SM & Evans RM (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor
308. *Cell* **55**, 899-906.
- Hollenberg SM, Giguere V, Segui P, & Evans RM (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor
1693. *Cell* **49**, 39-46.
- Holsboer F (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**, 477-501.
- Holsboer F, von BU, Wiedemann K, Muller OA, & Stalla GK (1987). Serial assessment of corticotropin-releasing hormone response after dexamethasone in depression. Implications for pathophysiology of DST nonsuppression. *Biol Psychiatry* **22**, 228-234.
- Hong W, Baniahmad A, Li J, Chang C, Gao W, & Liu Y (2009). Bag-1M inhibits the transactivation of the glucocorticoid receptor via recruitment of corepressors. *FEBS Lett* **583**, 2451-2456.
- Hong W, Baniahmad A, Liu Y, & Li H (2008). Bag-1M is a component of the in vivo DNA-glucocorticoid receptor complex at hormone-regulated promoter. *J Mol Biol* **384**, 22-30.
- Hsiao PW, Fryer CJ, Trotter KW, Wang WD, & Archer TK (2003). BAF60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 6210-6220.
- Hung WJ, Roberson RS, Taft J, & Wu DY (2003). Human BAG-1 proteins bind to the cellular stress response protein GADD34 and interfere with GADD34 functions. *Mol Cell Biol* **23**, 3477-3486.
- John S, Johnson TA, Sung MH, Biddie SC, Trump S, Koch-Paiz CA, Davis SR, Walker R, Meltzer PS, & Hager GL (2009). Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action. *Endocrinology* **150**, 1766-1774.
- Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, & Toft DO (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* **273**, 3679-3686.
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, & Herrlich P (1990). Antitumor Promotion and Antiinflammation - Down-Modulation of Ap-1 (Fos Jun) Activity by Glucocorticoid Hormone. *Cell* **62**, 1189-1204.
- Kabani M, McLellan C, Raynes DA, Guerriero V, & Brodsky JL (2002). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and S1s1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *Febs Letters* **531**, 339-342.

- Kanelakis KC, Morishima Y, Dittmar KD, Galigniana MD, Takayama S, Reed JC, & Pratt WB (1999). Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34134-34140.
- Kanelakis KC, Murphy PJM, Galigniana MD, Morishima Y, Takayama S, Reed JC, Toft DO, & Pratt WB (2000). hsp70 interacting protein hip does not affect glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery except to oppose the effect of BAG-1. *Biochemistry* **39**, 14314-14321.
- Kang Z, Pirskanen A, Janne OA, & Palvimo JJ (2002). Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* **277**, 48366-48371.
- Kato J (1994). [Gene expression and function of progesterone receptor isoforms]. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* **70**, 537-542.
- Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Krajewski S, & Reed JC (2002). Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death and Differentiation* **9**, 405-413.
- Kino T, De Martino MU, Charmandari E, Mirani M, & Chrousos GP (2003). Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 457-467.
- Kinyamu HK & Archer TK (2007). Proteasome activity modulates chromatin modifications and RNA polymerase II phosphorylation to enhance glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 4891-4904.
- Knee DA, Froesch BA, Nuber U, Takayama S, & Reed JC (2001). Structure-function analysis of Bag1 proteins - Effects on androgen receptor transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12718-12724.
- Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, & Weigel NL (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 8475-8483.
- Kucera T, Waltner-Law M, Scott DK, Prasad R, & Granner DK (2002). A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1
1943. *J Biol Chem* **277**, 26098-26102.
- Kullmann M, Schneikert J, Moll J, Heck S, Zeiner M, Gehring U, & Cato AC (1998). RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis
179. *J Biol Chem* **273**, 14620-14625.
- LaCasse EC & Lefebvre YA (1995). Nuclear-Localization Signals Overlap Dna-Binding Or Rna-Binding Domains in Nucleic Acid-Binding Proteins. *Nucleic Acids Research* **23**, 1647-1656.
- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, & Bukau B (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5452-5457.
- Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC, & Lombes M (2001). Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice

- overexpressing human mineralocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38911-38920.
- Lee SS, Crabb SJ, Janghra N, Carlberg C, Williams AC, Cutress RI, Packham G, & Hague A (2007). Subcellular localisation of BAG-1 and its regulation of vitamin D receptor-mediated transactivation and involucrin expression in oral keratinocytes: implications for oral carcinogenesis. *Exp Cell Res* **313**, 3222-3238.
- Levine S (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* **405**, 149-160.
- Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, & O'Malley BW (2003). Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* **23**, 3763-3773.
- Lifton RP, Gharavi AG, & Geller DS (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**, 545-556.
- Liman J, Ganesan S, Dohm CP, Krajewski S, Reed JC, Bahr M, Wouters FS, & Kermer P (2005). Interaction of BAG1 and Hsp70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 3715-3725.
- Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, Reed JC, & Zhang XK (1998). Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* **273**, 16985-16992.
- Lodish H, Berk A, Matsudaria P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2004). *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition.
- Lüders J, Demand J, & Höhfeld J (2000a). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome [In Process Citation] 721. *J Biol Chem* **275**, 4613-4617.
- Lüders J, Demand J, Papp O, & Höhfeld J (2000b). Distinct Isoforms of the Cofactor BAG-1 Differentially Affect Hsc70 Chaperone Function 880. *J Biol Chem* **275**, 14817-14823.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, & Sigler PB (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497-505.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, & Heim C (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* **10**, 434-445.
- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, & Stallcup MR (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 6164-6173.
- Macleod MR, Johansson IM, Soderstrom I, Lai M, Gido G, Wieloch T, Seckl JR, & Olsson T (2003). Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury. *Eur J Neurosci* **17**, 1549-1555.
- Maeng S, Hunsberger JG, Pearson B, Yuan P, Wang Y, Wei Y, McCammon J, Schloesser RJ, Zhou R, Du J, Chen G, McEwen B, Reed JC, & Manji HK (2008). BAG1 plays a critical role in regulating recovery from both manic-like and depression-like behavioral impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8766-8771.

- Malberg JE & Schechter LE (2005). Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des* **11**, 145-155.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, & Evans RM (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, & Reed JC (1998). p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *Embo Journal* **17**, 2736-2747.
- McIntyre WR & Samuels HH (1985). Triamcinolone acetonide regulates glucocorticoid-receptor levels by decreasing the half-life of the activated nuclear-receptor form. *J Biol Chem* **260**, 418-427.
- McKay LI & Cidlowski JA (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* **12**, 45-56.
- McLellan CA, Raynes DA, & Guerriero V (2003). HspBP1, an Hsp70 cochaperone, has two structural domains and is capable of altering the conformation of the Hsp70 ATPase domain. *J Biol Chem* **278**, 19017-19022.
- McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, & Hager GL (2000). The glucocorticoid receptor: Rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* **287**, 1262-1265.
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, & Yamamoto KR (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* **324**, 407-410.
- Milhon J, Lee S, Kohli K, Chen D, Hong H, & Stallcup MR (1997). Identification of amino acids in the tau 2-region of the mouse glucocorticoid receptor that contribute to hormone binding and transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **11**, 1795-1805.
- Minichiello L, Korte M, Wolfner D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, & Klein R (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**, 401-414.
- Mitra R, Ferguson D, & Sapolsky RM (2009). Mineralocorticoid receptor overexpression in basolateral amygdala reduces corticosterone secretion and anxiety. *Biol Psychiatry* **66**, 686-690.
- Modell S, Yassouridis A, Huber J, & Holsboer F (1997). Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology* **65**, 216-222.
- Moras D & Gronemeyer H (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 384-391.
- Morrison N & Eisman J (1993). Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J Bone Miner Res* **8**, 969-975.
- Naishiro Y, Adachi M, Okuda H, Yawata A, Mitaka T, Takayama S, Reed JC, Hinoda Y, & Imai K (1999). BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells. *Oncogene* **18**, 3244-3251.
- Niyaz Y, Frenz I, Petersen G, & Gehring U (2003). Transcriptional stimulation by the DNA binding protein Hsp46/BAG-1M involves hsp70/hsc70 molecular chaperones. *Nucleic Acids Res* **31**, 2209-2216.

- Niyaz Y, Zeiner M, & Gehring U (2001). Transcriptional activation by the human Hsp70-associating protein Hsp50 1311. *J Cell Sci* **114**, 1839-1845.
- Nollen EA, Kabakov AE, Brunsting JF, Kanon B, Hohfeld J, & Kampinga HH (2001). Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J Biol Chem* **276**, 4677-4682.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163.
- Oh WK & Song J (2003). Cooperative interaction of Hsp40 and TPR1 with Hsp70 reverses Hsp70-HspBp1 complex formation. *Mol Cells* **16**, 84-91.
- Okret S, Poellinger L, Dong Y, & Gustafsson JA (1986). Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5899-5903.
- Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joels M, & Lucassen PJ (2007). Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci* **26**, 3395-3401.
- Packham G, Brimmell M, & Cleveland JL (1997). Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem J* **328** (Pt 3), 807-813.
- Pearce D & Yamamoto KR (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* **259**, 1161-1165.
- Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Brasen JH, Schulz H, Gross V, Grone HJ, Nykjaer A, & Willnow TE (2006). Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* **26**, 7236-7245.
- Pickering BM, Mitchell SA, Evans JR, & Willis AE (2003). Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **31**, 639-646.
- Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, & Willis AE (2004). Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol* **24**, 5595-5605.
- Pitt B (2004). Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies. *Mol Cell Endocrinol* **217**, 53-58.
- Planchamp V, Bermel C, Tonges L, Ostendorf T, Kugler S, Reed JC, Kermer P, Bahr M, & Lingor P (2008). BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity. *Brain* **131**, 2606-2619.
- Prescott J & Coetzee GA (2006). Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* **231**, 12-19.
- Ray A & Prefontaine KE (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 752-756.

- Raynes DA & Guerriero V, Jr. (1998). Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem* **273**, 32883-32888.
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, & Schutz G (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-541.
- Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, & Gannon F (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER alpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular Cell* **11**, 695-707.
- Riad M, Mogos M, Thangathurai D, & Lumb PD (2002). Steroids 1932. *Curr Opin Crit Care* **8**, 281-284.
- Roemer SC, Donham DC, Sherman L, Pon VH, Edwards DP, & Churchill ME (2006). Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Mol Endocrinol* **20**, 3042-3052.
- Rozeboom AM, Akil H, & Seasholtz AF (2007). Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4688-4693.
- Rupprecht R, Reul JM, van SB, Spengler D, Soder M, Berning B, Holsboer F, & Damm K (1993). Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol* **247**, 145-154.
- Russell R, Wali KA, Mehl AF, & McMacken R (1999a). DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry* **38**, 4165-4176.
- Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, & Johnston SA (1999b). The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* **3**, 687-695.
- Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, & Yamamoto KR (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* **2**, 1144-1154.
- Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Hache RJ, & Lefebvre YA (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* **19**, 1025-1037.
- Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA, & Hache RJ (2001). Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol* **21**, 781-793.
- Schaaf MJM & Cidlowski JA (2003). Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: The importance of ligand affinity. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1922-1934.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, & Baldwin AS, Jr. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 943-953.

- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, & Moarefi I (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schmid W, Cole TJ, Blendy JA, & Schutz G (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 33-35.
- Schmidt U, Wochnik GM, Rosenhagen MC, Young JC, Hartl FU, Holsboer F, & Rein T (2003). Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **278**, 4926-4931.
- Schneikert J, Hubner S, Langer G, Petri T, Jaattela M, Reed J, & Cato ACB (2000). Hsp70-RAP46 interaction in downregulation of DNA binding by glucocorticoid receptor. *Embo Journal* **19**, 6508-6516.
- Schneikert J, Hubner S, Martin E, & Cato ACB (1999). A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. *Journal of Cell Biology* **146**, 929-940.
- Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson AD, Conneely OM, O'Malley BW, & Toft DO (1991). Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *J Biol Chem* **266**, 21165-21173.
- Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, & Evans RM (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226.
- Schülke JP (2009). Regulation von Steroidhormonrezeptoren und ihre physiologischen Wirkungen am Beispiel eines durch Stress regulierten Proteins. Dissertation
- Selye H (1936). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**, 32. (reprinted (1998), *Clin Neurosci* **10**, 230-231.)
- Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A, & Cato AC (2003). The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol* **23**, 7189-7197.
- Shomura Y, Dragovic Z, Chang HC, Tzvetkov N, Young JC, Brodsky JL, Guerriero V, Hartl FU, & Bracher A (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: Structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular Cell* **17**, 367-379.
- Sondermann H, Ho AK, Listenberger LL, Siegers K, Moarefi I, Wentz SR, Hartl FU, & Young JC (2002). Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 33220-33227.
- Stephenson G, Hammet M, Hadaway G, & Funder JW (1984). Ontogeny of renal mineralocorticoid receptors and urinary electrolyte responses in the rat. *Am J Physiol* **247**, F665-F671.
- Swamy N, Mohr SC, Xu W, & Ray R (1999). Vitamin D receptor interacts with DnaK/heat shock protein 70: identification of DnaK interaction site on vitamin D receptor. *Arch Biochem Biophys* **363**, 219-226.
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Ime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, & Reed JC (1997). BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* **16**, 4887-4896.

- Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, & Reed JC (1998). Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* **58**, 3116-3131.
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, & Reed JC (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**, 279-284.
- Takimoto GS, Tung L, bdel-Hafiz H, Abel MG, Sartorius CA, Richer JK, Jacobsen BM, Bain DL, & Horwitz KB (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 209-219.
- Tanimura S, Hirano AI, Hashizume J, Yasunaga M, Kawabata T, Ozaki KI, & Kohno M (2007). Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of hsp70 in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35430-35439.
- Tao Y, Williams-Skipp C, & Scheinman RI (2001). Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 2329-2332.
- Thornton JW (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5671-5676.
- Townsend PA, Stephanou A, Packham G, & Latchman DS (2005). BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 251-259.
- Trapp T & Holsboer F (1996). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 145-149.
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, & Holsboer F (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* **13**, 1457-1462.
- Tyson JR & Stirling CJ (2000). LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **19**, 6440-6452.
- Tzankov S, Wong MJ, Shi K, Nassif C, & Young JC (2008). Functional divergence between co-chaperones of Hsc70. *J Biol Chem* **283**, 27100-27109.
- van der LS & Meijer OC (2008). Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* **585**, 483-491.
- Wallace AD & Cidlowski JA (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* **276**, 42714-42721.
- Wallberg AE, Neely KE, Hassan AH, Gustafsson JA, Workman JL, & Wright AP (2000). Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain. *Mol Cell Biol* **20**, 2004-2013.
- Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L, Lamprecht C, Addicks GC, Hache RJ, & Lefebvre YA (2005). A serine/threonine-rich motif is one of three

- nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem* **280**, 17549-17561.
- Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, & Buchner J (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* **25**, 367-376.
- Wang HG, Takayama S, Rapp UR, & Reed JC (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7063-7068.
- Wang X & DeFranco DB (2005). Alternative effects of the ubiquitin-proteasome pathway on glucocorticoid receptor down-regulation and transactivation are mediated by CHIP, an E3 ligase. *Mol Endocrinol* **19**, 1474-1482.
- Wang Z, Chen W, Kono E, Dang T, & Garabedian MJ (2007). Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* **21**, 625-634.
- Weidinger E (2009). Funktionelle Charakterisierung von Mutanten des Mineralokortikoidrezeptors. Masterarbeit
- Williams SP & Sigler PB (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* **393**, 392-396.
- Wochnik GM (2004). Die Funktion der Cochaperone FKBP51, FKBP52 und p23 bei der Signaltransduktion der Corticoidrezeptoren. Dissertation
- Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, & Rein T (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* **280**, 4609-4616.
- Woolley CS, Gould E, & McEwen BS (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* **531**, 225-231.
- Xu M, Dittmar KD, Giannoukos G, Pratt WB, & Simons SS (1998). Binding of hsp90 to the glucocorticoid receptor requires a specific 7-amino acid sequence at the amino terminus of the hormone-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 13918-13924.
- Xu Q, Singer RA, & Johnston GC (1995). Sug1 modulates yeast transcription activation by Cdc68. *Mol Cell Biol* **15**, 6025-6035.
- Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater MM, Pater A, & Tang SC (1998). Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* **17**, 981-989.
- Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, & Karin M (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**, 1205-1215.
- Young AH (2006). Antiglucocorticoid treatments for depression. *Aust N Z J Psychiatry* **40**, 402-405.
- Young JC & Hartl FU (2000). Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J* **19**, 5930-5940.
- Zeiner M, Gebauer M, & Gehring U (1997). Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins 286. *EMBO J* **16**, 5483-5490.

Zeiner M, Niyaz Y, & Gehring U (1999). The hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription
464. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10194-10199.

Zennaro MC & Lombes M (2004). Mineralocorticoid resistance. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 264-270.

Zhang JH, Simisky J, Tsai FTF, & Geller DS (2005). A critical role of helix 3-helix 5 interaction in steroid hormone receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2707-2712.

Zhou R, Gray NA, Yuan P, Li X, Chen J, Chen G, mschroder-Williams P, Du J, Zhang L, & Manji HK (2005). The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers. *J Neurosci* **25**, 4493-4502.

Zobel AW, Yassouridis A, Frieboes RM, & Holsboer F (1999). Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am J Psychiatry* **156**, 949-951.

Lebenslauf

Name: Regina Theresia Maria-Anna Knapp
 Geburtsdatum: 14.08.1975
 Geburtsort: Traunstein
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: ledig

Ausbildung:

Seit 08/ 2004 Dissertation am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München unter der Leitung von Prof. Florian Holsboer. Thema: „Der Einfluss von Struktur- und Proteinwechselwirkungen auf die Funktion von Steroidhormonrezeptoren am Beispiel von BAG-1M und HspBP1 sowie Mutationen der Ligandenbindungsdomäne“

10/ 2003-06/ 2004 Diplomarbeit am Institut für Zoologie, Abt. Zell- und Entwicklungsbiologie, Department Biologie II der Ludwig-Maximilian-Universität, München: Thema: „Apoptose in Hydra: Mitochondrien-Lokalisation von apoptotischen Proteinen und die Identifizierung neuer Caspasegene in *Hydra vulgaris*“

09/ 1997-06/ 2004 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
 Hauptfach: Zellbiologie; Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie, medizinische Mikrobiologie

1986-1996 Rottmayr-Gymnasium Laufen, Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife
 1982-1986 Grundschule Tittmoning

Zur Veröffentlichung vorgesehene Manuskripte:

Schülke, J.P., Wochnik, G.M., Lang-Rollin I., Knapp R.T., Berning B., Rein T.

Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Schmidt U., Knapp R.T., Schülke J.P., Pyka T., Holsboer F., Rein T.

Requirement of the DNA binding domain of BAG-1 for inhibition of corticosteroid signaling. (in Vorbereitung)

Knapp R.T., Kozany C., Weidinger E., Hafner K., Holsboer F., Hausch F., Rein T.

The two nucleotide exchange factors HspBP1 and BAG-1M use different mechanisms to modulate steroid hormone receptor function.