

**Modulation der Interaktion
von Vitamin D₃-Rezeptor-Komplexen
mit Kernproteinen durch 1 α ,25(OH)₂D₃
und 1 α ,25(OH)₂D₃-Analoge**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

eingereicht von

Michaela Herdick

aus Grevenbroich

Düsseldorf

2000

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Signalübertragung durch nukleäre Hormone	1
1.2 Nukleäre Rezeptoren – eine Superfamilie	2
1.2.1 DNA-Bindung nukleärer Rezeptoren	4
1.2.2 Ligand-Bindung nukleärer Rezeptoren	6
1.3 Nukleäre Rezeptoren im zellulären Kontext	8
1.4 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	13
1.6 Der Vitamin D ₃ -Rezeptor (VDR)	15
1.6.1 1,25(OH) ₂ D ₃ -responsive Elemente (VDREs)	15
1.6.2 Die Interaktion des VDR mit Liganden	16
1.6.3 Der VDR im zellulären Kontext	18
1.7 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	
2.1 Material	22
2.1.1 Bakterienstämme	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 Geräte	23
2.1.5 <i>Kits</i>	23
2.1.6 Liganden	24
2.1.6.1 1,25(OH) ₂ D ₃ und 1,25(OH) ₂ D ₃ -Analoge	24
2.1.7 Nucleinsäuren	25
2.1.7.1 Expressionsvektoren	25
2.1.7.2. PCR-Primer für die C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteine	25
2.1.7.3 DNA-Konstrukte für die GST-Fusionsproteine	26
2.1.7.4 DNA-Konstrukte für das <i>Mammalian-One-Hybrid</i> -System	27
2.1.7.5 DNA-Konstrukte für das Luciferase-Reportergen-System	28
2.1.7.6 VDREs	28
2.1.7.7 DNA-Molekulargewichtsstandards	29
2.1.8 Puffer, Lösungen, Medien und Antibiotika	29
2.1.9. Sequenzierprimer	31
2.1.10 Software	31
2.1.11 Zellkulturmaterialien	32
2.1.12 Zelllinien	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1 <i>In vitro</i> Transkription	33
a) Aufreinigung von DNA-Matrizen	33
b) Transkriptionsansätze	34
2.2.1.2 <i>In vitro</i> Translation	34
2.2.1.3 <i>Gelshift-Assay</i>	35
a) <i>Annealing</i> von Oligonucleotiden	35
b) Klenow-Auffüllreaktion — Markierung von DNA mit [³² P]dCTP	36
c) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	36
d) <i>Gelshift-Assay</i>	37
e) <i>Supershift-Assay</i>	37

2.2.1.4	Limitierter Proteaseverdau (LPD)	38
a)	LPD mit monomeren Rezeptor-Proteinen	38
b)	LPD mit DNA komplexierten Heterodimeren	39
c)	LPD von VDR-RXR-VDRE-Kofaktor-Komplexen	39
d)	Proteintrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.2.1.5	PCR zur Erzeugung von C- und N-terminal verkürzten Koaktivator-Proteinen	41
2.2.1.6	Klonierung von GST-Fusionsproteinen mit C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteinen	41
a)	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	42
b)	Ligation	42
c)	Transformation in kompetente Epicurian XL1-Blue Zellen	43
d)	Präparation von Plasmid-DNA im Mini- oder Maxi-Maßstab	43
2.2.1.7	Sequenzierung	44
a)	Sequenzgel	45
2.2.1.8	Bakterielle Protein-Expression	45
a)	Protein-Aufreinigung	46
b)	Herstellung einer 50 %igen (v/v) GST-Sepharose- <i>Bead</i> -Mischung	47
2.2.1.9	GST- <i>Pulldown Assay</i>	47
2.2.1.10	Quantifizierung mit dem <i>Bioimager</i> (FLA-2000)	48
2.2.2	Zellbiologische Methoden - <i>in vivo</i> Untersuchungen	49
2.2.2.1	Kulturbedingungen für Cos-7, MCF-7 und HeLa-Zelllinien	49
2.2.2.2	Reportergen- <i>Assay</i> in Cos-7, MCF-7 und HeLa Zellen	50
3.	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung der repressorischen Eigenschaften des VDR	53
3.1.1	Intrinsische repressorische Eigenschaften des VDR	53
3.1.2	Interaktion des VDR mit Korepressoren <i>in vitro</i>	54
3.1.3	Charakterisierung der Ligand-abhängigen VDR-Korepressor-Dissoziation	56
3.1.4	Die VDR-Korepressor-Interaktion ist AF2-unabhängig	58
3.2	Untersuchung der Ligand- und Koaktivator-induzierten Genaktivierung durch den VDR	59
3.2.1	1,25(OH) ₂ D ₃ -induzierte Reportergen-Aktivität in HeLa-Zellen	59
3.2.2	Charakterisierung der DNA-unabhängigen VDR-Koaktivator-Interaktion	60
3.2.3	Interaktion des VDR-RXR-VDRE-Komplexes mit Koaktivatoren der SRC-1-Familie	62
3.2.4	Einfluß der AF2-Domäne auf die VDR-SRC-1-Interaktion	63
3.3	Modulation der VDR-Kofaktor-Interaktion	65
3.3.1	TIF2 modulierte Reportergen-Aktivität in Cos-7 Zellen	65
3.3.2	Ligand-abhängige Modulation der VDR-TIF2 Protein-Protein-Interaktion <i>in vitro</i>	67
3.3.3	Einfluß der Liganden auf die VDR-RXR-VDRE-Koaktivator-Komplexbildung	68
3.3.4	Funktionelle Konformationen des VDR	69
3.3.5	Modulationen der funktionellen Konformationen des VDR durch 1,25(OH) ₂ D ₃ -Analoge, DNA, Koaktivatoren und Korepressoren	70
3.3.6	Bedeutung der AF2-Domäne des VDR auf die Modulation der Konformationen durch Kofaktoren	73
3.3.7	Ligand-induzierte und Korepressor-modulierte Dissoziation	

des VDR-RXR-Heterodimers vom Korepressor	75
3.3.8 Bedeutung der Ligand-induzierten Verminderung der Korepressor-Dissoziation vom Heterodimer <i>in vivo</i>	76
3.3.9 Antagonistische Konformation des VDR: c2 _{LPD}	77
3.3.10 Ligand-induzierte Blockade einer VDR-Koaktivator-Interaktion	79
3.3.11 Bedeutung der Ligand-induzierten Blockade der VDR- Koaktivator-Interaktion für ein <i>in vivo</i> System	80
3.3.12 Charakterisierung antagonistischer Effekte von ZK159222	81
4. Diskussion	
4.1 Interaktion des VDR mit Korepressoren - Das Modell der VDR-vermittelten Genrepression	83
4.2 Interaktion des VDR mit Koaktivatoren - Das Modell der VDR-vermittelten Genaktivierung	86
4.3 Modulation der VDR-Konformationen	89
4.4 Ligand-induzierte Blockade der VDR-Koaktivator- Interaktion	92
4.5 Bedeutung der funktionellen Konformationen des VDR und ihre physiologische Relevanz	93
4.6 Ausblick und Perspektiven	97
5. Zusammenfassung	99
6. Literaturverzeichnis	101
7. Liste der Abbildungen und Tabellen	119

Publikationsliste

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

1. **Polly, P.***, **Herdick, M.***, **Moehren, U.**, **Baniahmad, A.**, **Heinzel, T.** und **Carlberg, C.** (2000) VDR-Alien: a novel, DNA-selective, vitamin D₃ receptor-corepressor partnership. *FASEB J.* 14, 1455-1463. * Beide Autoren sind an der Arbeit zu gleichen Teilen beteiligt.
2. **Herdick, M.**, **Bury, Y.**, **Quack, M.**, **Uskokovic, M.R.**, **Polly, P.** und **Carlberg, C.** (2000) Response element- and coactivator-mediated conformational change of the vitamin D₃ receptor permits sensitive interaction with agonists. *Mol. Pharmacol.* 57, 1206-1217.
3. **Herdick, M.**, **Steinmeyer, A.** und **Carlberg, C.** (2000) Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is mediated by a lack of ligand-induced VDR interaction with coactivators. *J. Biol. Chem.*, 275, 16506-16512.
4. **Herdick, M.**, **Steinmeyer, A.** und **Carlberg, C.** (2000) Carboxylic ester analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ show cell specific actions. *Chem. & Biol.*, 7, 885-894.
5. **Herdick, M.** und **Carlberg, C.** (2000) Agonist-triggered modulation of the activated and silent state of the vitamin D₃ receptor by interaction with corepressors and coactivators. *J. Mol. Biol.*, 299, im Druck.
6. **Bury, Y.**, **Herdick, M.**, **Uskokovic, M.R.** und **Carlberg, C.** (2001) Gene regulatory potential of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogues with two side chains. *J. Cell. Biochem.*, im Druck.
7. **Carlberg, C.**, **Quack, M.**, **Herdick, M.**, **Bury, Y.**, **Polly, P.** und **Toell, A.** (2001) Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D₃ analogues. *Steroids*, im Druck.

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ACTR	RAC3 Homolog	ID	Interaktionsdomäne
AD	Aktivierungsdomäne	IP	invertiertes Palindrom
AF1-Domäne	Ligand-unabhängige Transaktivierungsfunktion	IP9	invertiertes Palindrom im Abstand von 9 Nucleotiden
AF2-Domäne	Ligand-abhängige Transaktivierungsfunktion	IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
AIB1	RAC3 Homolog	K _a	Assoziations-Konstante
ANF	atrialer natriuretischer Faktor	kD	kilo Dalton
AP-1	<i>activator protein 1</i>	LBD	Ligand-Bindedomäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat	LPD	limitierter Proteaseverdau
AR	Androgen-Rezeptor	LUC	Luciferase
ARA70	<i>androgen receptor activator 70</i>	MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Motiv	N-	Amino-
bp	Basenpaare	NCoA-1	SRC-1 Homolog
BSA	Rinder-Serumalbumin	NCoA-2	TIF2 Homolog
C	Kohlenstoffatom	NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
C-	Carboxy-	NGFI-B	Nerven-Wachstumsfaktor I-B
c1 _{LPD}	VDR-Konformation 1 (im LPD)	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
c2 _{LPD}	VDR-Konformation 2 (im LPD)	P	Palindrom
c3 _{LPD}	VDR-Konformation 3 (im LPD)	p/CAF	Hefe-Homolog zu CBP
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	p300	Maus-Homolog zu CBP
cpm	<i>counts per minute</i>	PAS-Domäne	<i>Period/aryl hydrocarbon receptor/single minded domain</i>
d(A,C,T,G)	<i>Desoxy (adenosin, cytidin, thymidin, guanosin) triphosphat</i>	pH	Wasserstoff-Ionenkonzentration
ddNTP	Dideoxynucleotidtriphosphat	PPAR	Peroxisomen-Proliferations-aktivierender Rezeptor
DBD	DNA-Bindedomäne	PR	Progesteron-Rezeptor
DBP	Vitamin D ₃ Bindepotein	PTH	Parathormon
DMEM	<i>Dulbecos modified Eagles medium</i>	RAC3	<i>receptor-associated co-activator</i>
DMSO	Dimethylsulfat	RAR	Retinsäure-Rezeptor
DOTAP	N-[1-2,3Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat	RD	Repressionsdomäne
DR	direkte Wiederholung	Rev-ErbA	Reverser Erb-A-Rezeptor
DR3	direkte Wiederholung im Abstand von 3 Nucleotiden	RIP140	<i>receptor interacting protein140</i>
DR4	direkte Wiederholung im Abstand von 4 Nucleotiden	RNAse	Ribonuclease
DR6	direkte Wiederholung im Abstand von 6 Nucleotiden	rNTPs	Ribonucleotidtriphosphat
DRIP	<i>vitamin D₃ receptor interacting proteins</i>	RT	Raumtemperatur
DTT	1,4-Dithiothreitol	RXR	Retinoid-X-Rezeptor
EC ₅₀	halbmaximale aktivierende Konzentration	RZR/ROR	Retinoid-Z-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ER	Östradiol-Rezeptor	Sin3A	Histon-Deacetylase
EtOH	Ethanol	SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor</i>
FBS	fötale Rinderserum	Srb	Mediator-Proteine der Hefe
FL	<i>full length</i>	SRC-1	<i>steroid receptor cofactor-1</i>
GR	Glucocorticoid-Rezeptor	STAT-Protein	<i>signal transducer and activator protein</i>
GRIP1	TIF2 Homolog	T ₃ R	Thyroid-Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
H	Helix	TIF-1	SRC-1 Homolog
h	Stunde	TIF2	<i>transcriptional intermediary factor 2</i>
HAT	Histon-Acetylase	<i>tk</i>	Thymidinkinase-Promotor
HDAC	Histon-Deacetylase	TRAM-1	RAC3 Homolog
HRE	Hormon-responsives Element	TRAP	<i>thyroid receptor activating proteins</i>
		TSA	Trichostatin A
		UV	Ultraviolett
		VDR	Vitamin D ₃ Rezeptor
		VDRE	Vitamin D ₃ -responsives Element
		(w/v)	<i>weight per volume</i>
		z.A.	zur Analyse

1. Einleitung

1.1 Signalübertragung durch nukleäre Hormone

Hormone sind Botenstoffe, die eine Vielzahl von komplexen Vorgängen wie z.B. die Steuerung des Wachstums oder die Zelldifferenzierung koordinieren. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden. Hormone, die an Membran-Rezeptoren binden, gehören zu einer Gruppe, während die Hormone der zweiten Gruppe im Zellkern an Rezeptoren binden. Die Hormone der zweiten Gruppe werden daher auch als nukleäre Hormone bezeichnet. Nukleäre Hormone sind kleine lipophile Moleküle, die problemlos durch die Zell- und Kernmembran diffundieren können. Klassische Beispiele für nukleäre Hormone sind Steroidhormone wie Östradiol, Cortison, Aldosteron, Progesteron und Testosteron, das Schilddrüsenhormon 3,5,3'-L-Triiodothyronin und die Vitamin A- und D-Derivate, all-trans Retinsäure und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃].

Im Zellkern binden diese nukleären Hormone mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren (**Abb. 1**). Diese Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die wie alle Transkriptionsfaktoren über eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Transaktivierungsfunktion (hier genannt *activation-function 2*, AF2-Domäne) verfügen. Mittels der DBD binden sie an bestimmte DNA-Bindemotive (Hormon-responsive Elemente, HRE) in Promotorbereichen von Hormon-regulierten Genen. Die nukleären Rezeptoren besitzen darüber hinaus eine Ligand-Bindedomäne (LBD), die für die spezifische Interaktion des Rezeptors mit dem jeweiligen Hormon (Ligand) von Bedeutung ist. Die Bindung des Liganden an den nukleären Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung der LBD, wodurch die AF2-Domäne exponiert und die Bindung des Rezeptors an die DNA stabilisiert wird. Die Exposition der AF2-Domäne ermöglicht dem Rezeptor außerdem, mit Kofaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie zu interagieren, wodurch die Transkription des entsprechenden Hormon-regulierten Gens initiiert wird.

Nukleäre Rezeptoren unterscheiden sich von anderen Transkriptionsfaktoren insbesondere dadurch, daß sie durch Ligand-Bindung aktiviert werden können. Die primären Genprodukte der Hormon-regulierten Gene können im weiteren ihrerseits die Expression anderer Gene modulieren, so daß ein Hormon an einer Vielzahl von Prozessen direkt oder indirekt beteiligt sein kann. Durch die Bindung des Hormons an den nukleären Rezeptor

wird das Signal direkt weitergegeben, was ein deutlicher Unterschied zu der Signalübertragung bei Membran-Rezeptoren ist. Bei den Membran-Rezeptoren wird das primäre Signal über eine komplexe Kaskade weitergeleitet, wodurch das ursprüngliche Signal an Spezifität verlieren kann. Die Signalübertragung der nukleären Hormone ist im Gegensatz dazu ein viel spezifischer und direkter Weg der Genregulation.

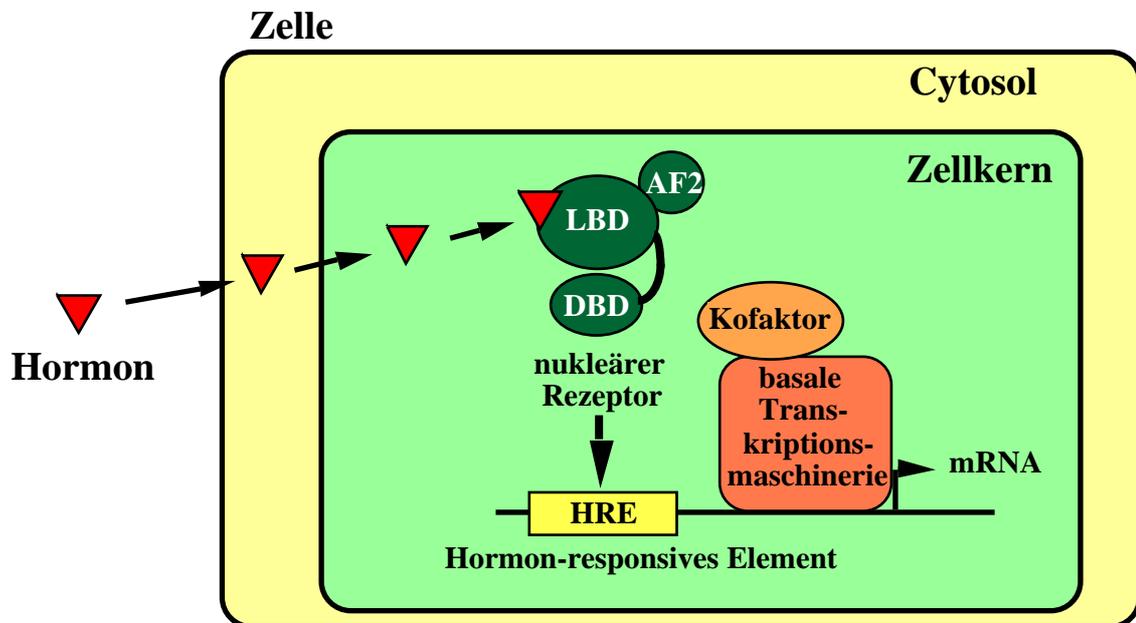


Abb. 1.: Signalübertragung durch nukleäre Rezeptoren. Schematische Darstellung der Signalübertragung nukleärer Hormone. Hormone diffundieren durch die Zell- und Kernmembran und binden im Zellkern an nukleäre Rezeptoren. Die Rezeptoren binden an DNA-Bindemotive, die sich in den Promotoren von Zielgenen befinden. Der Ligand-gebundene Rezeptor kann mit Kofaktoren interagieren, die den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie vermitteln und die Transkription der Gene initiieren.

1.2 Nukleäre Rezeptoren – eine Superfamilie

Nukleäre Rezeptoren kommen sowohl in Vertebraten, als auch in Arthropoden und Nematoden vor. Durch sie kontrollieren und regulieren Hormone komplexe physiologische Ereignisse wie Wachstum, Morphogenese, Zell-Proliferation, Zelldifferenzierung, Homöostase und programmierter Zelltod. Die cDNAs der Rezeptoren für alle acht bis dahin bekannten nukleären Hormone wie die des Glucocorticoid-Rezeptors (GR, [1]), Mineralocorticoid-Rezeptors (MR, [2]), Östradiol-Rezeptors (ER, [3]), Progesteron-Rezeptors (PR, [4]), Androgen-Rezeptors (AR, [5]), Thyroid-Rezeptors (T_3R , [6; 7]), Vitamin D_3 -Rezeptors (VDR, [8-10]) und des Retinsäure-Rezeptors (RAR, [11;

12]) wurden in der zweiten Hälfte der 80-iger Jahren kloniert. Einige der Rezeptoren haben mehrere Subtypen, die mit griechischen Buchstaben (–) bezeichnet werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der nukleären Rezeptoren hat gezeigt, daß es sich um strukturell verwandte Proteine handelt, die eine Superfamilie von Rezeptoren bilden [13-15]. Die natürlichen Liganden dieser acht Rezeptoren waren als Hormone schon lange Zeit vor ihrer Klonierung bekannt.

In den letzten Jahren konnten, basierend auf neuen Klonierungsstrategien, eine wachsende Anzahl neuer Mitglieder der nukleären Superfamilie identifiziert werden [16]. Von diesen zuletzt isolierten Rezeptoren waren die natürlichen Liganden zur Zeit der Isolierung nicht bekannt. Sie wurden daher als „verwaiste“ oder *Orphan*-Rezeptoren bezeichnet. Die prominentesten *Orphan*-Rezeptoren sind der Retinoid-X-Rezeptor (RXR, [17; 18]), der Peroxisomen-Proliferation-aktivierende-Rezeptor (PPAR, [19]), der Nerven-Wachstums-Faktor I-B (NGFI-B, [20]) der Reverse ErbA-Rezeptor (Rev-ErbA, [21; 22]) sowie der Retinoid-Z-Rezeptor (RZR/ROR, [23-25]).

Bis heute konnten 70 nukleäre Rezeptoren isoliert und beschrieben werden [26], von denen der größte Teil zu der Gruppe der *Orphan*-Rezeptoren gehört. Die Identifikation von potentiellen Liganden sowie die Klärung ihrer Funktion eröffnen weitreichende, besonders pharmakologisch interessante Perspektiven. Für viele nukleäre Rezeptoren gibt es mittlerweile eine ganze Reihe synthetischer Liganden, auch für einige *Orphan*-Rezeptoren konnten meist Cholesterin-Derivate als Liganden identifiziert werden [27].

Alle nukleären Rezeptoren haben einen sehr ähnlichen, modularen Aufbau (**Abb. 2**). Am Amino-terminalen Ende (N-Terminus) befindet sich die A/B-Domäne. Bei vielen Rezeptoren enthält diese Domäne eine Ligand-unabhängige konstitutiv aktive Transaktivierungsfunktion (AF1-Domäne). An die A/B-Domäne schließt sich die DBD an, die auch als C-Domäne bezeichnet wird. Die DBD beinhaltet zwei hochkonservierte Zinkfinger-Motive, die für die Interaktion der Rezeptoren mit der DNA von Bedeutung sind. Sie besteht aus 66 bis 70 Aminosäuren [28]. Eine flexible D-Region, Scharnier- oder *Hinge*-Region genannt, verbindet die DBD mit der LBD (E-Domäne). Die Flexibilität der D-Region ist wichtig, damit es zu einer freien Rotation zwischen DBD und LBD kommen kann. Am Carboxy-terminalen Ende (C-Terminus) bilden die ca. 250 Aminosäuren der LBD 12 -Helices [26]. In Helix 12 (H12) befindet sich die Ligand-abhängige AF2-Domäne, die aus sieben hochkonservierten Aminosäuren besteht [29]. Die LBD ist somit nicht nur wichtig für die eigentliche Ligand-Bindung des nukleären Rezeptors, sondern ist auch für die Interaktion mit Kofaktoren und den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie von Bedeutung. Durch Kontakt mit den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie wird die Transkription von Hormon-regulierten Genen induziert.

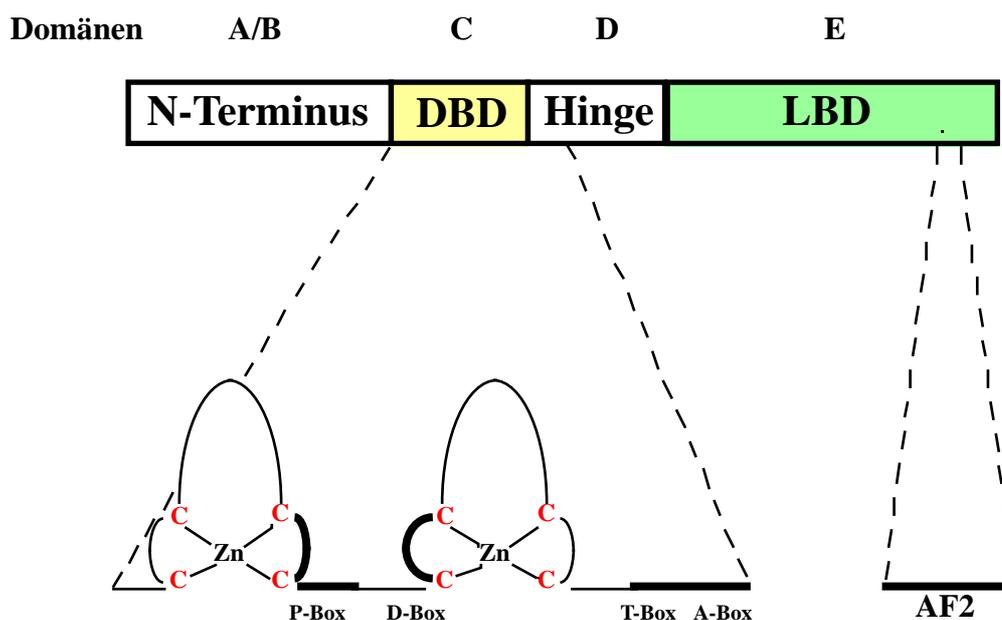


Abb. 2: Der modulare Aufbau nukleärer Rezeptoren. Nukleäre Rezeptoren können in die Domänen A-E unterteilt werden, diese entsprechen den funktionellen Bereichen. Der N-Terminus ist in seiner Größe sehr variabel und kaum konserviert. Die DBD dagegen ist hoch konserviert. Sie besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven mit verschiedenen funktionellen Subdomänen (P-, D-, T- und A-Box) und ist über die *Hinge*-Region mit der LBD verbunden. Die LBD enthält die Ligand-abhängige Transaktivierungsfunktion (AF2-Domäne).

1.2.1 DNA-Bindung nukleärer Rezeptoren

Die DNA-Bindung und damit die DBD nukleärer Rezeptoren ist essentiell für die Transaktivierung Hormon-regulierter Gene. Die funktionelle Einheit aus Rezeptor und HRE wird als Rezeptor-Komplex bezeichnet. Es gibt monomere, homodimere und heterodimere Rezeptor-Komplexe, da die nukleären Rezeptoren als Mono-, Homo- oder Heterodimer an ein HRE binden können. Heterodimerisierung ist eine Möglichkeit, um mit einer kleinen Anzahl an Rezeptoren möglichst viele funktionell verschiedene Komplexe zu generieren. Auch können so viele verschiedene Signalübertragungswege nukleärer Hormone koordiniert wirken. Diese Möglichkeit besteht bei monomeren oder homodimeren Rezeptor-Komplexen nicht.

Innerhalb der DBD und am Anfang der Scharnier-Region lassen sich weitere Bereiche [30] unterscheiden (**Abb. 2**). Die Aminosäurereste der A- und P-Box dienen dem direkten Kontakt mit dem Bindemotiv der DNA, während die Aminosäuren der D- und T-Box die Interaktion der Partnerproteine des Rezeptor-Komplexes stabilisieren.

Die ersten HREs (**Abb. 3**), die für nukleäre Rezeptoren identifiziert wurden, bestehen aus zwei Kopien eines hexameren Bindemotives (AGGTCA), welche als Palindrom (P) angeordnet sind [31]. Die meisten Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren sind in der Lage, das Bindemotiv RGGTCA (R = A oder G) zu erkennen. Die symmetrische Struktur des Bindemotives suggerierte, daß die Rezeptoren als Homodimere an das Element binden.

Die ersten natürlichen HREs, die für den VDR im Gen des Osteocalcin-Promotors [32; 33], für den T₃R im murinen Leukema-Virus [34] und für den RAR im RAR 2-Promotor [35] gefunden wurden, zeigen allerdings, daß Wiederholungen des Bindemotives nicht immer palindromische angeordnet sein müssen, es wurden auch direkte Wiederholungen (DR) und invertierte Palindrome (IP) gefunden.

Umeosono et al. [36] machten Vorhersagen über den Aufbau der Bindemotive für den VDR, T₃R und RAR, wonach es aus zwei direkten Wiederholungen des RGGTCA-Motives mit einem Abstand von drei, vier bzw. fünf Nucleotiden bestehen sollte. Diese Vorhersage wird als 3-4-5-Regel bezeichnet.

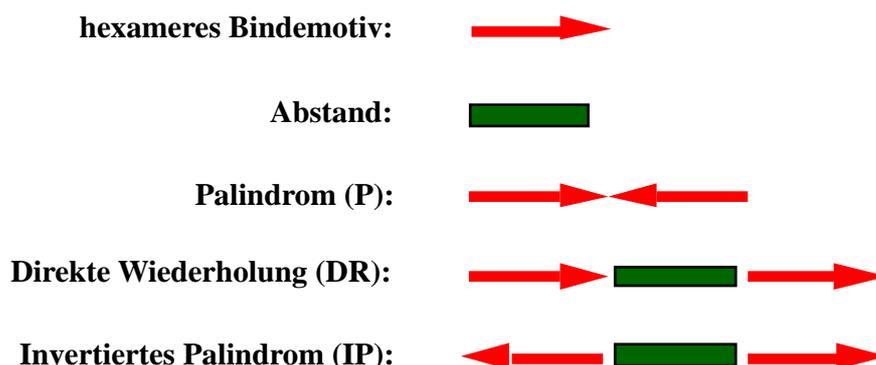


Abb. 3: Überblick über den Aufbau von HREs. Die beiden Bindemotive können als Palindrom (P), als direkte Wiederholung (DR) oder als invertiertes Palindrom (IP) angeordnet sein.

Aufgrund ihrer Eigenschaft als Mono-, Homo- oder Heterodimer mit dem jeweilige DNA-Bindemotiv zu interagieren, ist eine einfache Einteilung der nukleären Rezeptoren in drei Klassen möglich [37] (**Abb. 4**).

1. In die erste Klasse der nukleären Rezeptoren gehören die klassischen Steroidhormon-Rezeptoren wie GR, MR, ER, AR und PR, die ausschließlich Homodimere bilden [38-40]. Das HRE dieser Rezeptoren bestehen generell aus zwei palindromen Bindemotiven. Die DBDs der beiden Partner interagieren jeweils mit einem DNA-Bindemotiv, so daß symmetrische Strukturen entstehen [41].

2. Zu der zweiten Klasse der nukleären Rezeptoren gehören der VDR, T₃R und RAR. Sie binden als Heterodimere mit dem RXR an die DNA [42-44]. Bei ihrem HRE handelt es sich überwiegend um zwei direkte Wiederholungen des Bindemotives [45]. Diese Komplexe sind asymmetrisch geformt.
3. In der dritten Klasse sind die *Orphan*-Rezeptoren zusammengefaßt [16]. Diese Klasse kann anhand der unterschiedlichen Dimerisierungstypen (Monomer, Homodimer oder Heterodimer) in drei weitere Gruppen unterteilt werden (**Abb. 4**).

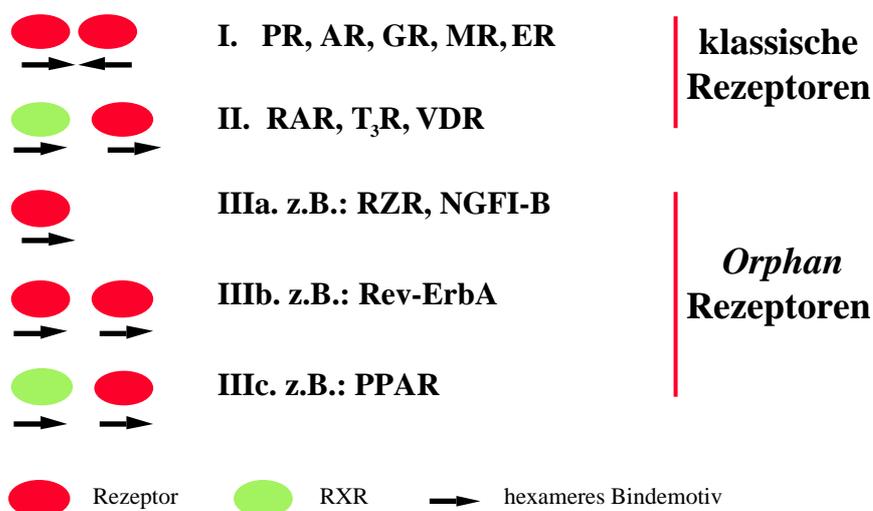


Abb. 4: Dimerisierungstypen nukleärer Rezeptoren auf verschiedenen HREs.

1.2.2 Ligand-Bindung nukleärer Rezeptoren

Bislang sind sieben Kristallstrukturen von LBDs nukleärer Rezeptoren bekannt. Hierbei handelt es sich um die Kristallstrukturen des RXR [46], RAR [47], TR [48], ER [49], PPAR [50], PR [51] und des VDR [52]. Die LBDs dieser nukleären Rezeptoren weisen einen allgemeinen Aufbau auf. Neben den 12 α -Helices (H1-12), besteht die LBD aus einem β -Faltblatt und einer β -Schleife. Die Zahl der Helices kann variieren, so fehlt sowohl im TR [48], als auch im RAR [47] die H2, während PPAR eine sehr kurze zusätzliche H2' besitzt. Die Daten der Kristallstruktur zeigen, daß die 12 α -Helices der LBDs wie ein dreilagiges Sandwich angeordnet sind (**Abb. 5**).

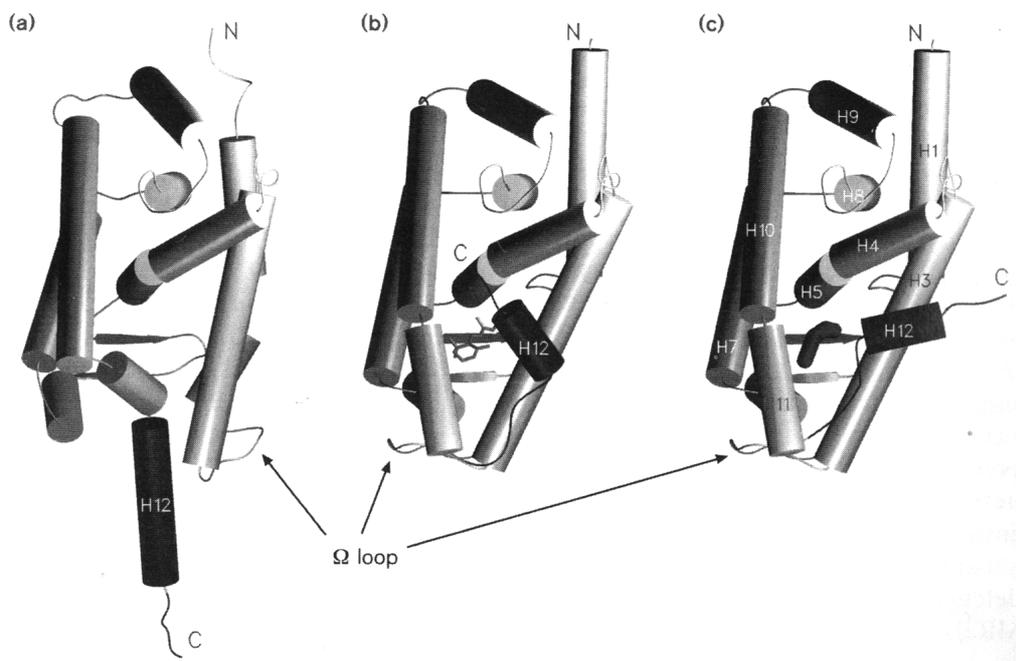


Abb. 5: Kristallstruktur der LBDs verschiedener nukleärer Rezeptoren. a) apo-RAR , b) holo-RAR , c) Antagonist-gebundener ER . [26].

Vergleiche der Kristallstrukturen von nicht Ligand-gebundenen Rezeptor (apo-Form, Beispiel apo-RAR) und Ligand-gebundenen Rezeptor (holo-Rezeptor, Beispiel holo-RAR) zeigten deutlich die Wirkung der Ligand-Bindung (**Abb. 5a-b**). Der größte Unterschied zwischen holo- und apo-RAR besteht in der Positionierung von H12, welche die konservierte AF2-Domäne beinhaltet. Im nicht Ligand-gebundenen Zustand weist H12 von der LBD weg. Die Ligand-induzierte Konformationsänderung bewirkt, daß H12 in Richtung H4 orientiert wird. Auch H11 wird durch Ligand-Bindung neu positioniert und verlängert dann in gerader Linie H10, während H11 vor Ligand-Bindung im rechten Winkel zu H10 lag. Die Ω -Schleife zwischen H2 und H3 wird bei der Konformationsänderung in Richtung H6 gedrückt, wodurch es zur Neigung von H3 kommt. Diese Neigung von H3 bewirkt, daß der Ligand-gebundene Rezeptor in seinem Umfang abnimmt [26].

Die Kristallstrukturen der LBDs bestätigen das sogenannte „Mausefallen-Modell“ [26], welches die Ligand-Bindung und die damit einhergehende Konformationsänderung beschreibt. Die Ligand-induzierte Konformationsänderung der LBD bewirkt, daß sich H12 anschließend in einer Position befindet, in der sie die Ligand-Bindetasche des nukleären Rezeptors verschließt. Der jeweilige Ligand wird in der Ligand-Bindetasche des

nukleären Rezeptors eingeschlossen. Es kommt außerdem zum Kontakt einiger Aminosäuren der H12 mit dem Liganden. Diese Interaktion stabilisiert den Komplex zusätzlich.

Die Kristallstruktur des Antagonist-gebundenen ER (**Abb. 5c**) zeigt deutlich, daß durch verschiedene Liganden unterschiedliche Rezeptor-Konformationen induziert werden. Die Bindung des Antagonisten induziert ebenfalls eine Konformationsänderung von H12. H12 ist nach der Konformationsänderung aber zwischen H3 und H4 positioniert. Verglichen mit der Positionierung von H12 eines Agonist-gebundenen ER, ist H12 beim Antagonist-gebundenen ER um 110° gedreht und um zehn Å verschoben [53]. Der „Deckel“ der „Mausefalle“ ist demnach nicht vollständig geschlossen, was wahrscheinlich durch eine zu große Seitenkette des Liganden bedingt ist [26]. Untersuchungen an Antagonist (RU468)-gebundenen PR haben gezeigt, daß möglicherweise die Interaktion des Rezeptors mit Kofaktoren beeinflusst wird [54].

Dem C-terminalen Ende der LBD kommt somit eine besondere Bedeutung für die Funktion nukleärer Rezeptoren zu, die auch durch die hohe Konservierung zwischen den verschiedenen nukleären Rezeptoren deutlich wird. Durch die Ligand-induzierte Konformationsänderung von H12 werden andere Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins exponiert. Diese Aminosäuren können mit Kofaktoren interagieren [26]. Die Interaktion nukleärer Rezeptoren mit Kofaktoren und den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie vermittelt die Transaktivierung von Hormon-regulierten Genen (siehe **Abb. 1**).

1.3 Nukleäre Rezeptoren im zellulären Kontext

Im Laufe der letzten Jahre konnten eine Reihe von Proteinen isoliert werden, die mit Agonist-gebundenen nukleären Rezeptoren interagieren. Diese Proteine sind in der Lage, die transkriptionelle Aktivität nukleärer Rezeptoren zu steigern [55; 56]. Sie wurden daher als Koaktivatoren bezeichnet. Bislang konnte eine ganze Reihe von Koaktivatoren isoliert werden. Hierzu zählen TIF1 (*transcriptional intermediate factor 1*) [57], RIP140 (*receptor interacting protein 140*) [58] und ARA70 (*androgen receptor activator 70*) [59]. Von besonderem Interesse erwies sich eine Protein-Familie von 160 kD großen Proteinen, die als SRC-Familie bezeichnet wird. Der Name leitet sich von dem zuerst isolierten Protein dieser Familie ab und kommt von *steroid receptor coactivator-1* (SRC-

1) [54]. Drei Proteine dieser Familie konnten bislang identifiziert werden. Neben SRC-1 gehören die Proteine TIF2 (*transcriptional intermediary factor 2*, [56]) und RAC3 (*receptor-associated co-activated 3*, [60]) zur SRC-Familie. Die Proteine tragen, bedingt durch eine Vielzahl von Homologen, noch zahlreiche weitere Namen. SRC-1 wird auch als NCoA-1 [61], TIF2 als GRIP1/NCoA-2 [62; 63] und RAC3 als ACTR/pCIP/AIB1/TRAM-1 bezeichnet [60; 64-66]. Bislang haben sich die Proteine der SRC-Familie nicht als Rezeptor spezifisch erwiesen.

Alle drei Proteine der SRC-Familie zeichnen sich durch einen konservierten Proteinaufbau und hohe Homologien aus (**Abb. 6**). Im N-Terminus befindet sich ein basisches Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH), woran sich zwei PAS-Domäne (*Per/Arnt/Sim*) und eine Serin/Threonin-reiche Region anschließt. Die Funktionen dieser Domänen sind allerdings bislang unklar [65]. Für die Interaktion mit nukleären Rezeptoren beinhalten die Interaktionsdomänen (IDs) der Kofaktoren hochkonservierte Motive mit der Konsensus-Sequenz LXXLL, (L = Leucin, X jede beliebige Aminosäure) [67; 68]. Desweiteren zeichnen sich die Proteine der SRC-Familie durch eine Transaktivierungsdomänen (AD) aus. Die LXXLL-Motive in der AD sind für eine Interaktion der Koaktivatoren mit weiteren Proteinen wichtig. Diese Proteine werden als Kointegratoren bezeichnet wie z.B. *CREB-binding protein* (CBP oder das Maus-Homolog p300) [53]. C-terminal befindet sich noch eine Glutamin-reiche Region, deren Funktion ebenfalls unklar ist.

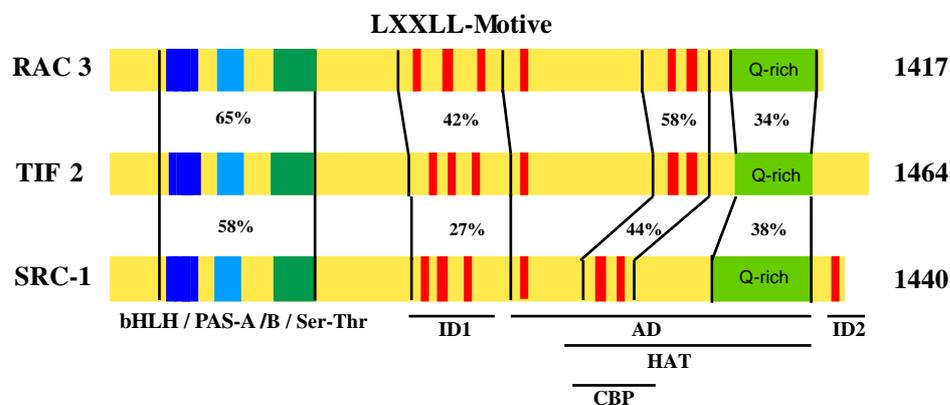


Abb. 6: Proteinaufbau der Koaktivatoren der SRC-Familie. Koaktivatoren zeichnen sich N-terminal durch eine bHLH-Domäne, zwei PAS-Domänen, eine Serin/Threonin-reiche Region aus. Die Funktionen dieser Domänen sind bislang unbekannt. Desweiteren besitzen Koaktivatoren zwei Interaktionsdomänen (ID), die die LXXLL-Motive (rot) enthalten. Diese Motive sind für eine Interaktion mit nukleären Rezeptoren von Bedeutung. An die erste ID schließt sich die Aktivierungsdomäne (AD) an. In diesem Bereich findet sich auch die Histon-Acetylaseaktivität (HAT) und die für die Interaktion mit den Kointegratoren (wie z.B. CBP) wichtigen Aminosäuren. C-terminal befindet sich eine Glutamin-reiche Region (Q-Region), deren Funktion unbekannt ist. Daran schließt sich die zweite ID an. Die Homologie der Proteine bzw. der Domänen ist in Prozent angegeben. Die Zahlen am Ende des jeweiligen Proteins gibt die Anzahl der Aminosäure an.

Durch Interaktion mit Kointegratoren kann die Transkription von Hormon-regulierten Genen weiter gesteigert werden, da Koaktivatoren und Kointegratoren synergistische Wirkung haben [69; 70].

Die Tatsache, daß sechs LXXLL-Motive in der Aminosäuresequenz der Koaktivatoren zu finden sind, scheint darin begründet zu sein, daß verschiedene dieser Motive für die Interaktion mit unterschiedlichen nukleären Rezeptoren notwendig sind. Für die Interaktion von SRC-1 mit den Rezeptoren T₃R und RAR scheint das zweite und dritte LXXLL-Motiv von Bedeutung zu sein, während für die Interaktion mit ER das zweite LXXLL-Motiv ausreicht [68].

Die Kristallstruktur des PPAR, bei der auch ein Teilfragment des SRC-1 Proteins co-kristallisiert wurde [71], zeigt, daß der Koaktivator mit den LXXLL-Motiven wie eine Klammer das Rezeptor-Dimer umschließt (**Abb. 7**). Der Kontakt der nukleären Rezeptoren mit dem Koaktivator erfolgt über die AF2-Domänen der Rezeptoren. Der Koaktivator bindet über zwei LXXLL-Motive an das PPAR-Dimer.

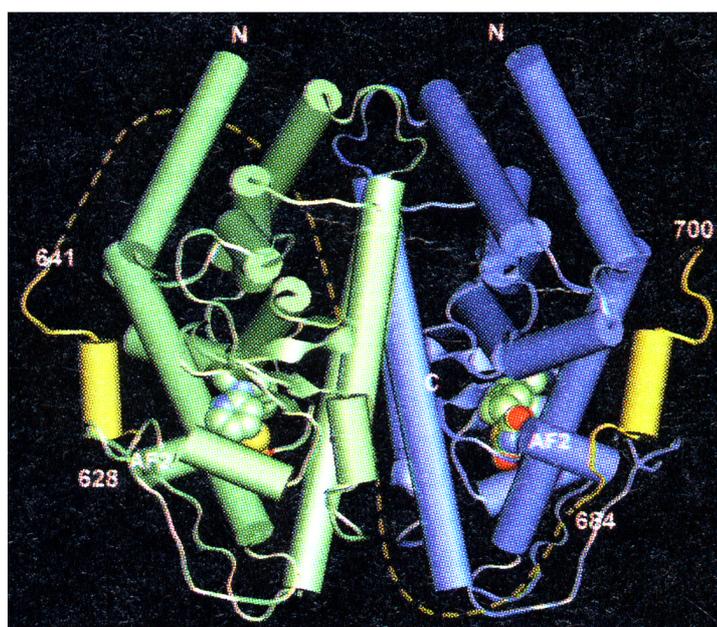


Abb. 7: Kristallstruktur der LBD des PPAR und die Lage des Kofaktors zur H12. In blau und grün ist der homodimere PPAR-Komplex dargestellt. Das co-kristallisierte SRC-1 Fragment ist in gelb dargestellt. Der Ligand ist als Kalottenmodell eingezeichnet. Abbildung aus [71]

Kofaktoren können außerdem durch die Vielzahl an LXXLL-Motiven mit anderen Rezeptor-assoziierten Proteinen einen multimeren Komplex bilden [53; 72]. In diesem Komplex interagiert der Koaktivator einerseits mit nukleären Rezeptoren, andererseits mit Kointegratoren [73]. Die Kointegratoren verfügen ebenfalls über LXXLL-Motive [74], mittels derer sie mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagieren können [75]. Für

CBP/p300 konnte gezeigt werden, daß es mit einer Reihe von allgemeinen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem AP-1 Protein (*activator protein 1*) oder dem STAT-Protein (*signal transducer and activator of transcription*) interagieren kann.

Sowohl für SRC-1 [76] als auch für CBP/p300 [77] konnte gezeigt werden, daß sie über intrinsische Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT-Aktivität) verfügen. Allerdings ist die HAT-Aktivität der Kointegratoren deutlich stärker. Eine Acetylierung von Histonen ist mit transkriptionell aktiven Chromatin verbunden. Durch Acetylierung der basischen Aminosäure Lysin an den Positionen 8 und 16 in Histon H4 sowie an den Lysinen 9 und 14 in Histon H3 [78] wird die Ladung der Aminosäuren neutralisiert. Die Affinität der Histone zur DNA vermindert sich und die Histone lösen sich ab. Als Konsequenz ändert sich die Konformation der Nucleosomen, wodurch mehr Platz für transkriptionell regulatorische Proteine ist. Da Histon-Acetylierung zu einer Öffnung der Chromatin-Struktur [78] führt, können HAT-Aktivität besitzende Proteine oder Protein-Komplexe in Folge dessen die Chromatin-Struktur modulieren. Histon-Acetylierung ist somit ein wichtiger Schritt in der Regulation der Gentranskription. Untersuchungen ergaben, daß verschiedene nukleäre Rezeptoren sich durch unterschiedliche HATs in ihrer transkriptionellen Aktivität modulieren lassen. Für den RAR konnte gezeigt werden, daß er nicht durch die HAT-Aktivität von CBP, sondern nur durch die HAT-Aktivität von p/CAF (Hefe Homolog zu CBP) aktiviert werden konnte [79].

Viele nukleäre Rezeptoren wie z.B. RAR und T₃R binden auch in Abwesenheit ihres Liganden an die entsprechenden HREs, wobei sie dann die Genaktivität des Zielgens reprimieren. Proteine, die mit nicht Ligand-gebundenen Rezeptoren assoziiert sind, werden als Korepressoren bezeichnet. Bekannte Korepressoren sind z.B. NCoR (*nuclear receptor corepressor* [80]) und das homologe Protein SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormon receptor* [81]), RIP13a [82], SUNCoR [83] sowie der erst kürzlich entdeckte Korepressor Alien [84]. NCoR und SMRT sind eine Protein-Familie von 270 kD großen Proteinen. Sie verfügen über drei Repressionsdomänen (RD 1-3) [85] und zwei Interaktionsdomänen (ID 1/2) [86]. NCoR und SMRT verfügen für die Interaktion mit nukleären Rezeptoren über ein ähnliches Motiv wie die Koaktivatoren der SRC-Familie. Dieses Motiv wird als CoRNR-Box-Motiv bezeichnet [87]. Das Hauptmotiv hat den Aufbau L/IXXI/VI [87]. Jeweils eines dieser Motive findet man in jeder ID (1/2). Das zuerst identifizierte Hauptmotiv wird möglicherweise durch einige weitere Aminosäuren ergänzt, so daß das vollständige Bindemotiv für die Korepressor-Rezeptor-Interaktion auf der Seite der Korepressoren aus den Aminosäuren LXXI/HIXXXI/L bestehen könnte [88]. Die für die Korepressor-Interaktion benötigten

Aminosäuren der Rezeptoren sind zur Zeit noch unbekannt. Möglicherweise liegen sie in H1, aber auch H10 und H11 werden diskutiert [52].

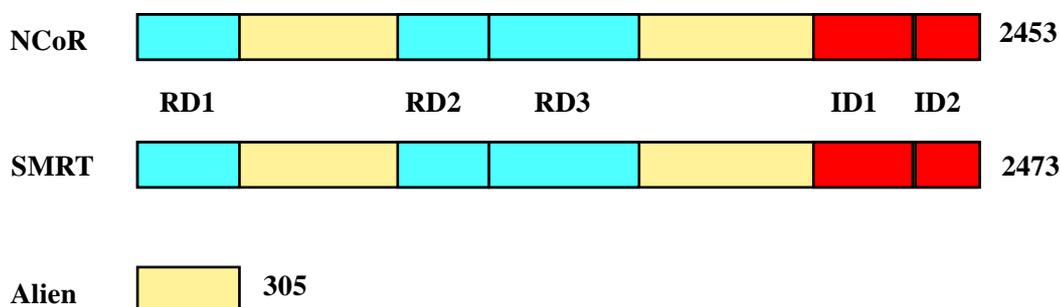


Abb. 8: Aufbau der Korepressoren. NCoR und SMRT zeichnen sich durch drei N-terminale Repressionsdomänen (RD, blau) und zwei Interaktionsdomänen (ID, rot) aus. Über den Aufbau von Alien ist bislang nichts bekannt. Die Zahlen am Ende der Proteine stehen für die Anzahl der Aminosäuren.

Alien ist im Vergleich zu diesen beiden Korepressoren mit einer Molekularmasse von 34 kD (305 Aminosäuren) deutlich kleiner. Er weist keine Übereinstimmungen mit NCoR und SMRT auf [84], sein Aufbau ist zur Zeit noch nicht geklärt (**Abb. 8**)

Schon seit mehr als 20 Jahren sind Reagenzien bekannt, die Inhibitoren von Histon-Deacetylasen sind und bei deren Verwendung in zellulären Untersuchungen eine Zunahme der Transkription beobachtet wird [89]. Hierzu gehören Substanzen wie z.B. Natrium-Butyrat, Trapoxin und Trichostatin A (TSA). Mit Hilfe des Deacetylase-Inhibitors Trapoxin konnte der menschliche Histon-Deacetylase-Komplex-1 (HDAC1) isoliert werden [78]. Es zeigte sich, daß dieser Protein-Komplex mit anderen Proteinen, die als Korepressoren (z.B. NCoR [90], SMRT [91]) bekannt waren, vorlag. Die Protein-Protein-Interaktion der Korepressoren mit HDAC-Komplexen erfolgt über die Repressionsdomänen der Korepressoren [92-94].

Da Histon-Acetylierung in die Aktivierung von Transkription involviert ist, ist es nicht weiter erstaunlich, daß Histon-Deacetylierung an der Repression der transkriptionellen Genaktivität beteiligt ist. Durch eine Histon-Deacetylierung wird die Nucleosomen-Struktur verdichtet, wodurch eine Transkription eines in diesem DNA-Bereich liegenden Gens nicht mehr möglich ist.

Die Signalübertragung nukleärer Hormone und die Transkription der entsprechenden Hormon-regulierten Gene ist also primär abhängig von der Bindung und Stabilisierung des Rezeptor-Komplexes. Die Transkriptionseffizienz des Zielgens wird aber, durch weitere Proteine wie Koaktivatoren und Kointegratoren moduliert. Die Wirkung dieser

Proteine kann ihrerseits wiederum, durch Phosphorylierung moduliert werden [95]. Die Repression eines Hormon-regulierten Gens wird neben den nukleären Rezeptoren ebenfalls durch weitere Proteine wie die Korepressoren und die HDAC beeinflusst.

Die Wirkung von Hormonen auf die Expression von Zielgenen erfolgt über nukleäre Rezeptoren, deren Aktivität durch Interaktion mit weiteren Proteinen feinreguliert wird.

1.4 $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Die physiologisch aktive Form von Vitamin D_3 ist $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 [abgekürzt $1,25(OH)_2D_3$]. $1,25(OH)_2D_3$ ist ein Secosteroid, das eine gemeinsame Vorstufe mit dem Cholesterin hat und sich durch eine vollständige Seitenkette und einen offenen B-Ring auszeichnet (siehe **Abb. 9**). Physiologische Bedeutung kommt $1,25(OH)_2D_3$ bei der Calcium- und Phosphor-Aufnahme, der Knochenbildung [96] und der Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphor-Homöostase [97] zu. Zusätzlich hat es Einfluß auf die Zell-Differenzierung, Zell-Proliferation und Apoptose [98].

$1,25(OH)_2D_3$ -Mangel führt zu einem verminderten Mineral-Metabolismus und beeinflusst so die Zahnentwicklung und den Knochenaufbau. Der Phänotyp dieser Mangelerkrankung wird als „Rachitis“ bezeichnet. $1,25(OH)_2D_3$ -Mangel ist eine der häufigsten Ursachen für Osteoporose (Verlust der Knochenstabilität). Diese Krankheit ist eine Folge von Alterungsprozessen und wird auf eine verminderte Produktion von $1,25(OH)_2D_3$ zurückgeführt. Da zu hohe Dosen an $1,25(OH)_2D_3$ auf der anderen Seite zur Hypercalcämie und zur Hypercalcuria führen [99], kann Osteoporose-Patienten nicht unbegrenzte Mengen an $1,25(OH)_2D_3$ zur Vorbeugung gegeben werden. Der Einsatz von $1,25(OH)_2D_3$ -Analogen könnte eine Möglichkeit sein, diese Krankheit zu behandeln.

Vitamin D_3 , welches auch als Prohormon bezeichnet wird, wird zum Teil über die Nahrung (z.B. Seefisch, Butter) aufgenommen. Die überwiegenden Mengen an $1,25(OH)_2D_3$ werden allerdings in der Haut sowie Leber und Niere aus 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D_3) synthetisiert. Der Begriff „Vitamin“ wird deshalb für $1,25(OH)_2D_3$ im eigentlichen Sinne nicht korrekt angewendet. Aus Provitamin D_3 (**Abb. 9**) wird in der Haut mit Hilfe von UV-Strahlung (290-310 nm) Vitamin D_3 gebildet. Hierbei wird durch die Energie der Strahlung der B-Ring des Provitamin D_3 geöffnet. Anschließend erfolgen zwei enzymatische Hydroxylierungen an den Kohlenstoffatomen der Positionen C1 und C25. In der Leber wird das Vitamin D_3 dann zunächst zu 25-Hydroxyvitamin D_3 hydroxyliert [100] und anschließend erfolgt eine weitere Hydroxylierung in der Niere und

anderen Organen zu der biologisch aktiven Form $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 . In der Niere findet auch der Abbau von $1,25(OH)_2D_3$ durch die 24-Hydroxylase statt. Das Gen der 24-Hydroxylase wird durch $1,25(OH)_2D_3$ induziert und ist ein Biomarker für die Wirkung von $1,25(OH)_2D_3$. Der Transport von $1,25(OH)_2D_3$ und seiner Metabolite an seinen Wirkort erfolgt im Blut. Dabei ist es gebunden an das Vitamin D_3 -Bindeprotein (DBP), welches zu den Albuminen gehört. Die Affinität von $1,25(OH)_2D_3$ zu DBP ist relativ gering ($K_a = 50$ nM). Die $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentrationen im Plasma beträgt etwa $0,1$ nM [97], dies entspricht $30-60$ pg/ml.

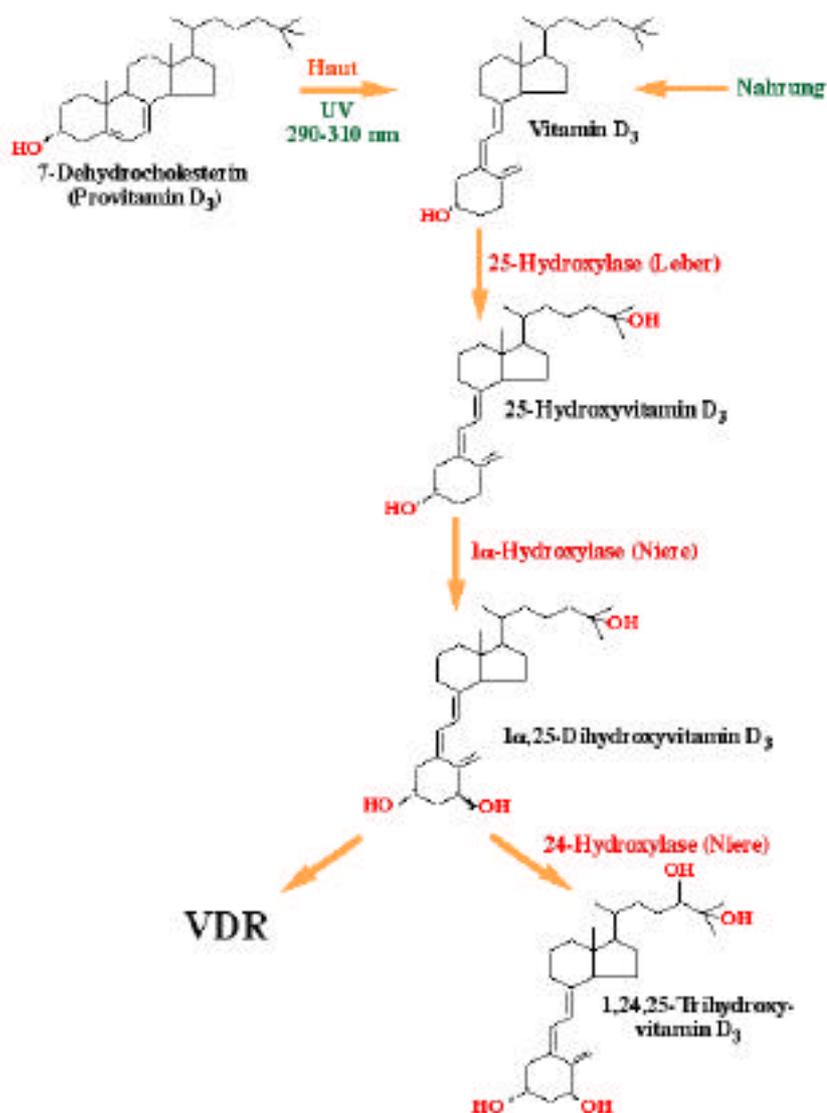


Abb. 9: Syntheseweg von $1,25(OH)_2D_3$. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 ist die biologisch aktive Form von Vitamin D_3 . Vitamin D_3 wird in der Haut gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen und anschließend in zwei Hydroxylierungsschritten in der Leber und der Niere in die aktive Form $1,25(OH)_2D_3$ umgewandelt. Der Abbau erfolgt ebenfalls in der Niere.

1.6 Der Vitamin D₃-Rezeptor (VDR)

Alle für 1,25(OH)₂D₃ beschriebenen positiven (Knochenaufbau) und negativen Wirkungen (Hypercalcämie) werden durch den VDR vermittelt. Die Affinität, mit der 1,25(OH)₂D₃ an seinen Rezeptor bindet, ist mit $K_a = 0,1$ nM sehr hoch. Die funktionelle Relevanz von 1,25(OH)₂D₃ und ein Beleg der Beteiligung des VDR an der Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ wird an VDR *knock-out*-Mäusen deutlich [101]. Diese Mäuse zeigten alle Symptome des als 1,25(OH)₂D₃-Mangel charakterisierten Rachitis-Phänotypen. Zu diesem Erscheinungsbild gehört das Auftreten von Kahlheit (Alopezie), Hypocalcämie sowie erhebliche Deformationen an den Knochen. VDR *knock-out*-Mäuse sterben meist innerhalb der ersten 15 Wochen ihres Lebens. Frühe Letalität kann allerdings bei menschlichen Patienten mit Rachitis nicht beobachtet werden.

Das Gen des menschlichen VDR liegt auf Chromosom 12 und umfaßt ca. 75 kb [102]. Die 12 Exons dieses Gens werden in ein 427 Aminosäuren großes Protein übersetzt [8]. Bislang konnte nur ein Gen des VDR gefunden werden, während für einige verwandte Rezeptoren wie z.B. T₃R und RAR mehrere Gene identifiziert werden konnten [103; 104]. Der N-terminale Bereich des VDR-Gens ist sehr kurz, daher besteht die A/B-Domäne des VDR aus nur 23 Aminosäuren. Der VDR enthält demnach keine AF1-Domäne. In dieser sehr kurzen Region befindet sich aber das einzige beschriebene Allel der codierenden Region des VDR. Bei etwa der Hälfte aller Menschen werden die ersten drei Aminosäuren des VDR nicht translatiert. Bei diesen Menschen wird erst das an Position 4 vorkommende Methionin als Translationsstart benutzt. Bislang ist die physiologische Relevanz der beiden VDR-Formen (424 oder 427 Aminosäuren) noch nicht vollständig geklärt [102; 105].

Der Promotor des VDR-Gens enthält keine TATA-Box, dafür lassen sich DNA-Bindemotive für eine ganze Reihe von allgemeinen Transkriptionsfaktoren (SP-1, AP-1 und NF- κ B [25; 106]) identifizieren. Bindemotive für den VDR kommen im Promotor des VDR-Gens nicht vor, was vermuten läßt, daß die Regulation des VDR-Gens, wenn überhaupt, dann nur indirekt, durch 1,25(OH)₂D₃ vermittelt wird.

1.6.1 1 α ,25(OH)₂D₃-responsive Elemente (VDREs)

Bislang konnten einige funktionelle 1,25(OH)₂D₃-responsive Elemente (VDREs) charakterisiert werden [107]. In Übereinstimmung mit der 3-4-5-Regel [36] handelt es sich bei den meisten dieser VDREs um eine direkte Wiederholung des Bindemotives mit

einem Abstand von drei Nucleotiden (DR3-Typ VDRE, siehe Kapitel 1.2.1). Darüber hinaus wurden aber auch VDREs gefunden, die von der 3-4-5-Regel abweichen. Im Promotor des Pit-1-Gens der Ratte [108] und im Promotor des Calbindin D₂₈-Gens der Maus [109] konnten VDREs identifiziert werden, die eine DR4-Typ Struktur der Bindemotive aufweisen. Bindemotive vom DR6-Typ konnten im 24-Hydroxylase Promotor des Ratten-Gens [110], im menschlichen Osteocalcin-Gen [111] sowie im Fibronectin-Gen bei Mensch, Maus und Ratte gefunden werden [112]. Außerdem wurden natürliche VDREs gefunden, bei denen die Bindemotive als invertiertes Palindrom angeordnet sind wie z.B. beim c-fos-Gen [113]. Der Abstand der Bindemotive beträgt bei diesen VDREs neun Nucleotide (IP9-Typ VDRE, [114]).

Der VDR bildet überwiegend Heterodimere mit dem RXR aus, aber auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren (T₃R [115], RAR [116]) oder Homodimere sind möglich. Die Bindung des VDR-RXR-Heterodimers an strukturell verschiedenen VDREs (DR-Typ und IP-Typ VDRE) erfordert ein hohes Maß an Flexibilität [117]. Auf DR-Typ VDREs sind die DBDs der beiden Rezeptoren asymmetrisch angeordnet, während sie auf einem IP-Typ VDRE symmetrisch angeordnet sind (**Abb. 10**) [98].

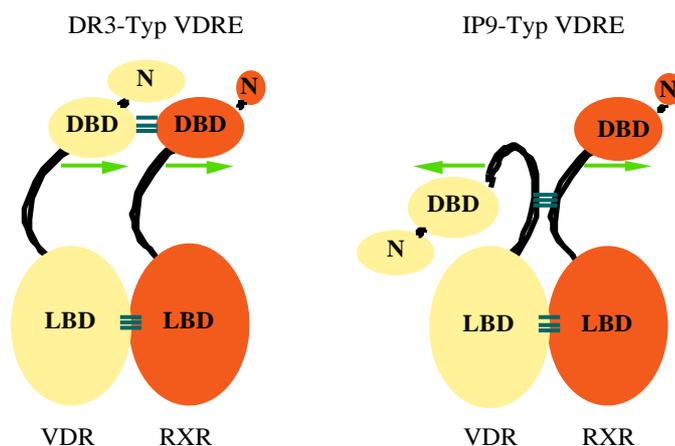


Abb. 10: VDR-RXR-Heterodimere auf DR3-Typ und IP9-Typ VDREs. Das Modell zeigt die Interaktion des VDR-RXR-Heterodimers auf unterschiedlich strukturierten VDREs. Auf dem DR3-Typ VDRE liegen die beiden DBDs der Partnerproteine auf der selben Seite der DNA, während sie beim IP9-Typ VDRE auf unterschiedlichen DNA-Seiten angeordnet sind.

1.6.2 Die Interaktion des VDR mit Liganden

Die Kristallstruktur der LBD des VDR, die seit kurzem verfügbar ist [52], bestätigte die zuvor mittels Computer erstellten dreidimensionalen Modelle [118]. Der genaue Anfangspunkt der 300 Aminosäuren langen LBD des VDR ist nicht bekannt, ihr Aufbau entspricht aber dem unter 1.2.2 beschriebenen Aufbau der LBDs nukleärer Rezeptoren.

Aufgrund der Tatsache, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein breites Spektrum physiologischer Effekte zeigt, ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für viele Behandlungen wie Schuppenflechte (Psoriasis), Krebs oder Stoffwechselstörungen von therapeutischem Interesse [119]. Die Einsatzmöglichkeiten sind jedoch durch die Nebenwirkungen (Hypercalcämie) von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stark eingeschränkt. Deshalb wurde versucht, Analoge mit einem selektiven biologischen Profil zu erhalten. Nach diesem biologischen Profil sollten die Analoge einen starken antiproliferativen Effekt zeigen, aber nur gering calcämisch sein.

Etwa 80 % der bisher synthetisierten 2000 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analoge tragen Modifikationen an der Seitenkette des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Moleküls. Beispiele für Analoge mit Modifikationen der Seitenketten sind Gemini, welches an Position C20 zweimal die Seitenketten des natürlichen Hormons trägt, oder 20-epi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (MC1288) (Struktur siehe 2.1.6.1). Viele dieser $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analoge weisen allerdings nur eine schwache biologische Wirksamkeit auf, da sie meist schlecht an den VDR binden können. Andere Analoge, die gut an den VDR binden können, haben sich teilweise als ebenso calcämisch wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwiesen und sind deshalb für den therapeutischen Einsatz ungeeignet.

Einige Analoge zeigen jedoch das gewünschte biologische Profil und werden zum Teil auch schon in der Klinik eingesetzt. Das bekannteste $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analog ist das unter dem Handelsnamen Daivonex erhältliche Schuppenflechte-Therapeutikum MC903 [120]. Es wird auf die Haut aufgetragen und aktiviert für einige Stunden lokal alle VDR-Moleküle in den Keratinocyten. Es ist genauso potent wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kann aber schneller metabolisiert werden und zeigt geringe Affinität zum DBP, wodurch keine calcämischen Nebeneffekte auftreten.

Ein weiteres $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analog, welches zur Zeit in klinischen Studien der Phase III getestet wird, ist EB1089. EB1089 ist 50 % weniger calcämisch als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß es selektiv starke antiproliferative Wirkung auf Brustkrebszellen hat [121]. Erste vielversprechende Ergebnisse wurden bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs durch Verabreichung von EB1089 erzielt [122].

Ebenfalls von besonderem Interesse ist das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analog OCT, welches bei Hyperparathyroismus verabreicht wird. Es inaktiviert gezielt das Parathormon-Gen (PTH). Von diesem Analog konnte auch gezeigt werden, daß es selektiv bestimmte VDR-Kofaktor-Interaktion vermittelt [123].

Der Nachweis von Ligand-induzierten Konformationsänderungen nukleärer Rezeptoren ist eine Möglichkeit, die Ligand-Rezeptor-Interaktion zu verstehen. Allerdings ist der Nachweis von Rezeptor-Konformationen über Kristallstrukturen langwierig und schwierig und bietet daher nicht die Möglichkeit, eine Vielzahl von Analogen zu untersuchen. Eine andere Möglichkeit ist der limitierte Proteaseverdau (LPD), der auf einer Ligand-

induzierten Veränderung von Protease-Schnittstellen (z.B. für Trypsin oder Chymotrypsin) im Rezeptor basiert [124]. Die Ligand-abhängigen Protease-resistenten Rezeptor-Fragmente werden als funktionelle Rezeptor-Konformationen interpretiert [125-127].

Für den Ligand-gebundenen VDR wurden nach Verdau mit der Protease Trypsin drei verschiedene Protease-resistente Fragmente mit einer Molekularmasse von 28, 25 und 23 kD erhalten. Diese drei Fragmente werden als Repräsentanten der VDR-Konformation $c1_{LPD}$, $c2_{LPD}$ und $c3_{LPD}$ interpretiert. Mit den meisten Analogen erhält man eine Stabilisierung des Rezeptors in den Konformationen $c1_{LPD}$ und $c3_{LPD}$. Nur wenige Analoge stabilisieren den Rezeptor in der Konformation $c2_{LPD}$. Bislang konnte nur der Konformation $c1_{LPD}$ eine physiologische Bedeutung zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um die agonistische Konformation des VDR [128]. 1, $25(OH)_2D_3$ -Analoge oder Liganden, die den VDR in dieser Konformation stabilisieren, haben sich als potent erwiesen.

1.6.3 Der VDR im zellulären Kontext

Die vielfältigen Effekte, die durch 1, $25(OH)_2D_3$ vermittelt werden, können nicht alleine durch verschiedene Dimerisierungspartner auf unterschiedlichen VDREs zurückgeführt werden, zumal die Komplexbildung nur der erste Schritt bei der Genaktivierung ist. Die durch 1, $25(OH)_2D_3$ vermittelte Genaktivität erfordert eine direkte Interaktion des VDR mit Kofaktoren, die den Kontakt zu den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen. Diese Proteine modulieren selbst oder durch Kontakt mit weiteren Proteinen, die Struktur des Chromatins, wodurch die Transkriptionseffizienz des entsprechenden Hormon-regulierten Gens beeinflusst wird (Kapitel 1.3). Eine *in vitro* Interaktion des VDR mit einigen Koaktivatoren (SRC-1) konnte bereits gezeigt werden [129]. Die Aminosäuren des VDR, die an der Interaktion mit den Koaktivatoren beteiligt sind, befinden sich in der AF2-Domäne von H12 [129]. Die Positionierung von H12 und damit die Koaktivator-Interaktion ist Ligand-abhängig. Die Interaktion des VDR mit den Kofaktoren hängt somit hauptsächlich von DNA- und Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen ab. Es ist möglich, daß manche Konformationen eine selektive Interaktion mit Koaktivatoren erlauben, wie für das Analog OCT gezeigt werden konnte [123].

Obwohl Zellspezifität von Kofaktoren häufig diskutiert wird, haben Expressionsstudien bisher keine Unterschiede in den Expressionsmengen von Koaktivatoren aufzeigen

können [130]. Die Ergebnisse der SRC-1 *knock-out* Maus, haben gezeigt, daß andere Koaktivatoren die Funktion von SRC-1 kompensieren können [127]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es keine selektiven Unterschiede zwischen den Koaktivatoren der SCR-Familie gibt. Die beobachteten Analog-abhängigen zellspezifischen Unterschiede [125] liegen demnach auch eher in einer selektiven Induktion von Rezeptor-Konformationen begründet.

Eine VDR vermittelte Repression verschiedener $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierter Gene (z.B. PTH) ist seit langem bekannt [103; 131]. Eine intrinsische repressorische Eigenschaft des VDR oder eine Interaktion des VDR mit Korepressoren wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, daß der VDR mit den bekannten Korepressoren interagieren kann, da sich die bekannten Korepressoren bislang nicht als Rezeptor-spezifisch erwiesen haben. Der Einfluß der Ligand-Bindung auf eine bestehende Rezeptor-Korepressor-Interaktion ist noch weitgehend unbekannt. Diese Interaktion ist aber ebenfalls von den an der Oberfläche zugänglichen Aminosäuren abhängig, wodurch auch diese Interaktion Ligand-abhängig und dadurch modulierbar wird.

Generell haben aber auch, zellulären Mechanismen die als „cross-talk“ bezeichnet werden, Einfluß auf die Regulation der Gene. Hierzu zählen unter anderem die zelluläre Rezeptor-Stöchiometrie, die Konkurrenz um Partnerrezeptoren und um Kofaktoren [132], die Inhibierung der Komplex-Ausbildung durch andere Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1 oder NF- κ B [133]) und die Phosphorylierung des VDR [134]. All diese Faktoren dürften ebenfalls Einfluß auf die VDR-vermittelte Genaktivität und die pleiotropen Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ haben.

1.7 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

1,25-Dihydroxyvitamin D_3 ist ein nukleäres Hormon, das in einer Vielzahl von physiologischen Effekten involviert ist. Zu diesen Effekten zählen neben der Calcium-Homöostase auch zelluläre Effekte, die den Zellzyklus betreffen. Alle beschriebenen Effekte von $1,25(OH)_2D_3$ werden durch den VDR vermittelt, der als Heterodimer mit dem RXR an strukturell verschiedenen VDREs binden kann. VDR-RXR-VDRE-Komplexe stellen somit den Ausgangspunkt für multiple $1,25(OH)_2D_3$ -Signalwege dar. Sie werden als Grundlage für den molekularen Mechanismus der Genaktivierung von $1,25(OH)_2D_3$ -regulierten Genen verstanden. Durch Interaktion des VDR mit Kofaktoren wird die Genaktivität des $1,25(OH)_2D_3$ -regulierten Gens moduliert. Dabei kommt es zur Stimulation der Transkription des Gens, wenn der VDR mit Koaktivatoren interagiert, während möglicherweise die VDR-vermittelte Repression durch Interaktion des VDR mit Korepressoren bedingt ist. Die Interaktion des VDR mit Kofaktoren ist strikt Ligand-abhängig. Ligand-abhängig ist auch die Stabilisierung der VDR-Konformationen, von denen bisher drei bekannt sind.

Diese Arbeit soll sich auf eine detaillierte molekulare Analyse der Interaktion des VDR mit Kofaktoren (Koaktivatoren und Korepressoren) konzentrieren sowie den Einfluß der Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen auf die Rezeptor-Kofaktor-Interaktion untersuchen. Im diesem Zusammenhang sollen die drei Ligand-induzierten VDR-Konformationen näher charakterisiert werden. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Ist die Fähigkeit des VDR, Genaktivität zu reprimieren, durch die Interaktion des VDR mit Korepressoren zu erklären und sind die auftretenden Mechanismen der Repression vergleichbar mit denen anderer Rezeptoren, d.h. kann ein Einfluß von Histon-Deacetylasen nachgewiesen werden? Ist die VDR-Korepressor-Interaktion Ligand-abhängig im Verständnis einer Ligand-abhängigen Genaktivierung?
2. Kann eine Ligand-abhängige Interaktion des VDR mit den Koaktivatoren der SRC-Familie nachgewiesen werden und gibt es Unterschiede bezüglich der Ligand-induzierten Interaktion des VDR mit einzelnen Koaktivatoren? Kann die Bedeutung der Aminosäuren der AF2-Domäne für die VDR-Koaktivator-Interaktion bestätigt werden?

3. Hängt die Konformation des VDR allein vom Ligand ab oder gibt es auch hier zusätzliche modulierende Parameter? Gibt es z.B. einen gegenseitigen Einfluß zwischen der Bindung von Kofaktoren und der Ligand-induzierten Konformation des Rezeptors?
4. Ist es möglich die VDR-Korepressor-Dissoziation oder die VDR-Koaktivator-Interaktionen durch verschiedene Liganden zu modulieren?
5. Welche funktionelle Relevanz haben die verschiedenen Konformationen des VDR? Kann man den unterschiedlichen Konformationen eine physiologische Bedeutung zuordnen? Welche Rolle spielen die einzelnen Konformationen bei der Rezeptor-Kofaktor-Interaktion?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

- **Epicurian XL1-Blue:** rec A1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lac^q Z M15 Tn10 (Tet')] (Stratagene, Heidelberg)
- **BL21(DE3)pLysS:** E.coli BF⁻ dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) gal (DE3) [pLysS Cam^r] (Stratagene)

2.1.2 Chemikalien

DOTAP:	Roth (Karlsruhe)
Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i> (4B):	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
IPTG:	Roche Diagnostics (Mannheim)
Radiochemikalien: ([³⁵ S]-Methionin; [³² P]-dCTP)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
RNasin <i>Ribonuclease Inhibitor</i> :	Promega (Mannheim)
TSA:	Wako Pure Chemicals (Japan)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien in z.A. Qualität wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biorad (München)
 Merck (Darmstadt)
 Riedel-de Häen (Seelze)
 Promega
 Serva (Heidelberg)
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)

2.1.3 Enzyme

Klenow-DNA-Polymerase:	Promega
native <i>PfU</i> DNA-Polymerase:	Stratagene
Restriktionsendonukleasen: (<i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)	Promega
<i>Shrimp</i> -Alkalische-Phosphatase:	Roche-Diagnostics
Taq-Polymerase:	Life Technologies (Eggenstein)
T ₄ -DNA-Ligase:	Promega
T ₇ -DNA-Polymerase:	Amersham-Pharmacia
T ₇ -RNA-Polymerase:	Promega
Trypsin (<i>Seq. Grade Modified Trypsin, Porcine</i>):	Promega

Die Enzyme wurden unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen mit den dazugehörigen Reaktionspuffern verwendet.

2.1.4 Geräte

<i>Bioimager</i> FLA 2000:	Fuji (Tokyo, Japan)
Gel-Trockner Modell 538:	Biorad
Gelkammern, Mini- und Maxi- (horizontal):	Biorad
Gelkammer, Mini- (vertikal):	Biorad
Gelkammer V15-17 (vertikal):	Life Technologies
<i>Multilabelcounter</i> Lucy2:	Anthos (Salzburg, Österreich)
<i>Multilabelcounter</i> Victor 1420:	Wallac (Freiburg)

2.1.5 Kits

-Galactosidase-Reporter-Gen-Assay:	Roche Diagnostics
Bio-Rad-Protein-Assay:	Biorad
<i>in vitro</i> Transkriptionskomponenten:	Promega

Luciferase-Reportergen-Assay:	Canberra-Packard (Groningen, Niederlande)
QIAquick Gel <i>Extraction Kit</i> :	Qiagen (Hilden)
<i>Rabbit Reticulocyten Lysate System</i> :	Promega
Wizard™ <i>Maxiprep DNA Purification System</i> :	Promega
Wizard™ <i>Miniprep DNA Purification System</i> :	Promega

2.1.6 Liganden

Alle benutzten Liganden wurden in Isopropanol gelöst und ausgehend von dieser Stammlösung in DMSO (bei allen *in vitro Assays*, außer dem *GST-Pulldown Assay*) oder Ethanol (bei allen *in vivo Assays* und dem *GST-Pulldown Assay*) weiter verdünnt.

2.1.6.1 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analoge

Die Struktur der Seitenketten von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowie den verwendeten $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analogen ist abgebildet. Das Steroidgrundgerüst ist bei allen Analogens identisch und unter (R =) abgebildet (**Abb. 11**).

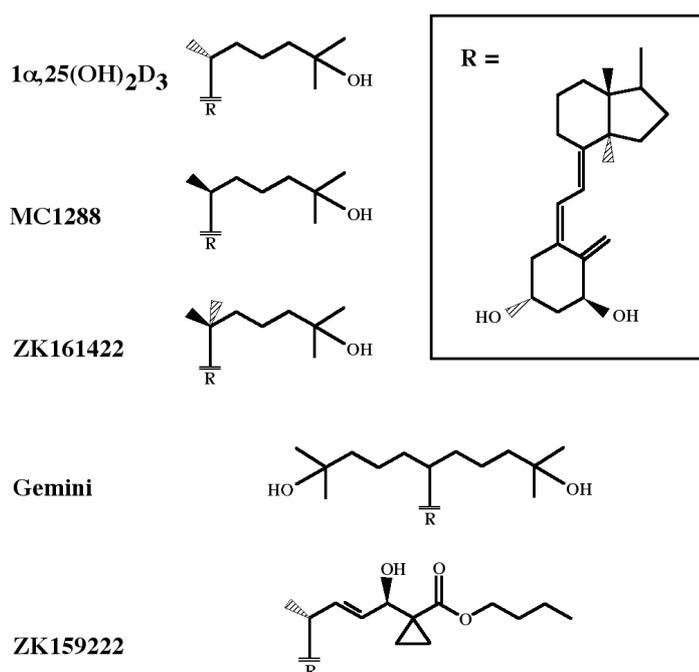


Abb. 11: Strukturen der verwendeten Analoge.

2.1.7 Nucleinsäuren

2.1.7.1 Expressionsvektoren

Ausgangsmaterial für die *in vitro* Synthese (Transkription und Translation), Mutagenese und Transfektion der untersuchten nukleären Rezeptoren und Kofaktoren waren Konstrukte der Expressionsplasmide pSG5 (Stratagene), pCMX [80] sowie pAB [84] (**Tab. 1**). Folgende Plasmid- und cDNA-Konstrukte wurden verwendet:

cDNA	Organismus/Herkunft	Klonierungsschnittstellen
pSG5-VDR [135]	Mensch	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pSG5-RXR [136]	Mensch	<i>Eco</i> RI/ <i>Bg</i> II
pSG5-TIF2 [56]	Mensch	<i>Eco</i> RI
pCMX-RAC3 [66]	Mensch	<i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI
pCMX-SRC-1 [54]	Mensch	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
pCMX-NCoR [80]	Maus	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I
pAB-Alien [84]	Mensch	<i>Sma</i> I/ <i>Xho</i> I
pCH110	Amersham-Pharmacia	-

Tab. 1: Expressionsvektoren. Die Tabelle zeigt die verwendeten Expressionsvektoren

2.1.7.2. PCR-Primer für die C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteine

Für die *in vitro* Synthese von C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteine (der Index bezeichnet die Aminosäureposition innerhalb der jeweiligen Proteine) wurden folgende Primerkombinationen (**Tab. 2**) für die PCR verwendet:

Kofaktor	Primersequenz (5'-3')	
SRC-1 ₅₉₆₋₇₉₀	<i>sense-Primer</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCATGATTCAGTCCGACAACAGC
	<i>antisense-Primer</i>	GTTACAAGGATCCATCTGTTC
TIF2 ₆₄₆₋₉₂₆	<i>sense-Primer</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCATGACCAAATCTGATCAGATGGG
	<i>antisense-Primer</i>	ATCATCCCTTGATTACCCATC
RAC3 ₆₇₃₋₁₁₀₆	<i>sense-Primer</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCATGCATGGGTCACTGTTACAAG
	<i>antisense-Primer</i>	CTGATCCATCATTACTGCTGC

Tab. 2: Primerkombinationen. Abgebildet sind die für die PCR von C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteine verwendeten Primer.

Bei der **fett** markierten Nucleinsäuresequenz handelt es sich um die Erkennungssequenz der T₇-DNA-Polymerase.

2.1.7.3 DNA-Konstrukte für die GST-Fusionsproteine

Alle aufgeführten Fragmente wurden im Leserraster mit der Thrombin-Schnittstelle entweder in den *Polylinker* des GST-Fusionsvektor pGEX-KGK oder pGEX-AHK (beide Amersham-Pharmacia) subkloniert (**Tab. 3**). Die Sequenzen der Polylinker sahen wie folgt aus, wobei die Thrombin-Schnittstelle *kursiv* und die Schnittstellen der verwendeten Endonucleasen **fett** dargestellt sind:

pGEX-KGK:

5'-GGA TCT CGT CGT GCA TCT GTT GGA TCC CCG GGA ATT TCC GGT GGT GGT
 EcoRI *NcoI* *XhoI* *HindIII*
 GGT GGA ATT CTA GAC TCC ATG GGT CGA CTC GAG CTC AAG CTT AAT-3'

pGEX-AHK:

5'-GGA TCT CGT CGT GCA TCT GTT GGA TCC CCG GGA ATT TCC GGT GGT GGT
 EcoRI *NotI* *NcoI* *XhoI*
 GGT ATT GAA TTC GTC GAC TCT AGA GCG GCC GCT CCA TGG CTC GAG CTC
 HindIII
AAG CTT AAT-3'

Folgende DNA-Konstrukte von GST-Fusionsproteinen wurden verwendet:

Protein (Organismus)	Vektor	Aminosäureregion des Proteins	Klonierungsschnittstellen
VDR (Mensch)	pGEX-KGK	1-427	<i>BamHI/HindIII</i>
SRC-1 * (Mensch)	pGEX-KGK	596-790	<i>BamHI/HindIII</i>
TIF2 * (Maus)	pGEX-KGK	646-926	<i>BamHI/HindIII</i>
RAC3 * (Mensch)	pGEX-KGK	673-1106	<i>BamHI/HindIII</i>
NCoR [#] ₁₆₇₉₋₂₄₅₃ (Maus)	pGEX-AHK	1679-2453	<i>NcoI(NcoI/NotI)</i>
NCoR [#] ₂₂₁₈₋₂₄₅₃ (Maus)	pGEX-AHK	2218-2453	<i>NcoI/NotI</i>
Alien** (Mensch)	pGEX-KGK	1-305	<i>EcoRI/XhoI</i>

Tab. 3: DNA-Konstrukte. Die Tabelle zeigt die DNA-Konstrukte der verwendeten GST-Fusionsproteine.

Die mit einem Stern* versehenen Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Die anderen Konstrukte wurden mir mit freundlichen Dank von PD Dr. Banhiamad (**, Uni-Gießen) und Dr. Heinzl (#, Uni-Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

C- und N-terminal verkürzter Kofaktoren wurden mittels PCR mit den in **Tab. 4** aufgeführten Primern hergestellt. Die DNA-Matrizen wurden anschließend in den GST-Vektor (pGEX-KGK) subkloniert.

Kofaktor	Primersequenz (5'-3')	
SRC-1 ₅₉₆₋₇₉₀	<i>sense-Primer</i>	ATT GGATCC ATTTCAGTCCGACAACAGC
	<i>antisense-Primer</i>	ATTA AAGCTT CAGTTACAAGGATCCATCTGTTC
TIF2 ₆₄₆₋₉₂₆	<i>sense-Primer</i>	ATT GGATCC ACCAAATCTGATCAGATGGAG
	<i>antisense-Primer</i>	ATTA AAGCTT CATATCATCCCTTGATTACCCATC
RAC3 ₆₇₃₋₁₁₀₆	<i>sense-Primer</i>	ATT GGATCC CATGGGTCACTGTTACAAG
	<i>antisense-Primer</i>	ATTA AAGCTT CACTGATCCATCATTACTGCTGC

Tab. 4: Primer. Die Tabelle zeigt die für die Primer, die für die Herstellung von C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Konstrukten, die für die Klonierung in den GST-Vektor verwendet wurden. Die **fett** markierten Nucleinsäuren markieren die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (*sense-Primer*) und *Hind*III (*antisense-Primer*).

2.1.7.4 DNA-Konstrukte für das *Mammalian-One-Hybrid-System*

Bei den Konstrukten des *Mammalian-One-Hybrid-Systems* wurde die DBD des Hefe Transkriptionsfaktors Gal4 (aa 1-147) hinter den CMV-Promotor kloniert und mit den unten aufgeführten cDNAs fusioniert. Das Reportergenkonstrukt bestand aus drei Kopien der Gal4-Bindestelle, die vor dem Thymidinkinase-Promotor (tk) und ein Luciferase-Reporter (LUC) fusioniert worden war (**Abb. 12**). Folgende Plasmid- und cDNA-Konstrukte wurden verwendet:

- Gal4_{DBD}-CMV (Kontrollvektor)
- Gal4_{DBD}-VDR_{LBD} (aa 109-427)
- Gal4_{DBD}-T₃R_{1LBD} (aa 165-461)
- Gal4_{DBD}-NCoR-ID1 (aa 1-393)
- (Gal4)₃-tk-LUC

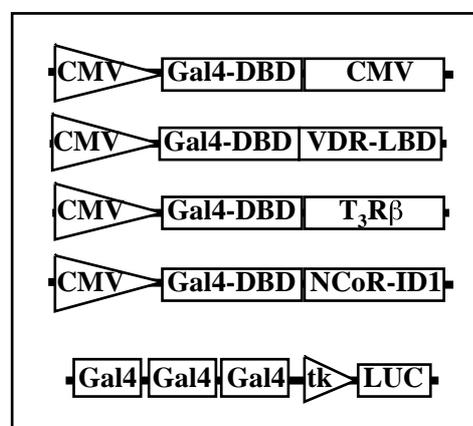


Abb. 12: Konstrukte für den *Mammalian-One-Hybrid-Assay*

2.1.7.5 DNA-Konstrukte für das Luciferase-Reportergen-System

Bei den Vektoren für das Luciferase-Reportergen-System handelt es sich um die Vektoren, die auch für die *in vivo* Translation und Transkription verwendet wurden (siehe 2.1.7.1). Beim Luciferase-Reportergen-System besteht das Reportergen aus vier Kopien eines vor den *tk*-Promotor fusioniertem VDRE (im Beispiel, das DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors) und dem LUC-Reportergen. Die Nukleotidsequenz des VDR- und RXR-Gens sowie einiger Kofaktoren wurden hinter einen SV40-Promotor im pSG5-Vektor (Stratagene) fusioniert (**Abb. 13**). Die unten abgebildeten Konstrukte sind beispielhaft. Die übrigen verwendeten Konstrukte sind unter (2.1.7.1) aufgeführt:

- pSG5-VDR
- pSG5-RXR
- pSG5-TIF2
- (DR3)₄-*tk*-LUC
- (IP9)₄-*tk*-LUC

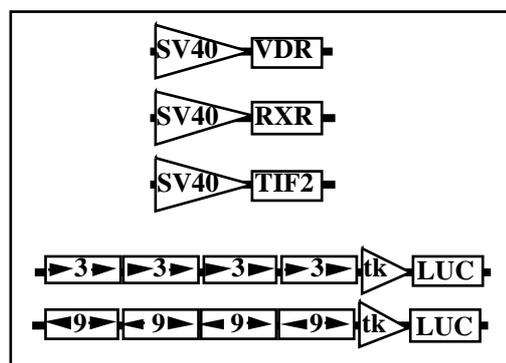


Abb. 13: Konstrukte für den Luciferase-Reportergen-Assay

2.1.7.6 VDREs

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten VDREs dargestellt. Bei den hervorgehobenen Nucleotiden handelt es sich um das Haupt-Bindemotiv (**Tab. 5**).

DNA-Bindemotiv	Gen (Organismus)	Nucleotidsequenz
DR3-Typ VDRE	ANF (Ratte) [110]	AGAGGTCATGAAGGACA
DR3/DR6-Typ VDRE	Osteocalcin (Ratte) [33]	TTTGGT <u>GACTC</u> ACCGGGTGAACGGGGGA AP-1
IP9-Typ VDRE	c-fos (Maus) [114]	TGACCCTGGGAACCGGGTCCA

Tab. 5: Aufbau der VDREs. Dargestellt sind die verwendeten VDREs

Die abgebildeten VDREs wurden sowohl als Oligonucleotide in *Gelshift-Assays* als auch als Fusionskonstrukt im Luciferase-Reportergen-System verwendet.

2.1.7.7 DNA-Molekulargewichtsstandards

Bei Agarosegelen wurden wahlweise folgende Molekulargewichtsmarker aufgetragen:

- 100 bp Marker: Amersham-Pharmacia
- *HindIII* Marker: Promega

Beide Molekulargewichtstandards wurden auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und aliquotiert bei -20° C aufbewahrt.

2.1.8 Puffer, Lösungen, Medien und Antibiotika

Acrylamid-Stammlösung (40 %):	Verhältnis Acrylamid/N,N-Methylen-Bisacrylamid (32,5 : 1)
Aminosäuremix komplett:	1 mM je Aminosäure (Promega)
Aminosäuremix ohne Methionin:	1 mM je Aminosäure, kein Methionin (Promega)
Ampicillin (1000 x):	100 mg/ml (in dH ₂ O gelöst)
basischer Puffer (-Gal-Assay):	Roche Diagnostics
-Galactosidase-Substrat:	Roche Diagnostics
Chloramphenicol (1000 x):	40 mg/ml (in 100% (v/v) Ethanol gelöst)
<i>Column wash solution I:</i>	8,3 mM Tris/HCl (pH 7,5); 80 mM Kaliumacetat; 0,04 mM EDTA; 50 % (v/v) Ethanol (Promega)
<i>Column wash solution II:</i>	80 % (v/v) Ethanol
DidesoxyNucleotid-Abbruchmische:	80 µM dNTP; 80 µM ddATP, ddCTP, ddGTP, (ddNTP) oder ddTTP, 50 mM NaCl
DMEM:	1,0 g/l Glucose, Pyridoxin-HCl, NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin, ohne Phenolrot (Sigma-Aldrich)
<i>Enzyme-dilution-buffer:</i>	20 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer (pH 7,4); 20 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 50% (v/v) Glycerin (Amersham-Pharmacia)
Ethidiumbromid (20000 x):	10 mg/ml
Ficoll/TBE-Puffer:	50 % (v/v) Ficoll; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (in 1 x TBE)

1 x <i>Gelshift-buffer</i> :	10 mM Hepes (pH 7,9); 1 mM DTT; 0,2 µg/µl poly(dI/dC); 5 % (v/v) Glycerin
8 %ige Gelshift-Stammlösung:	8 % Acrylamid [Verhältnis Acrylamid/N,N-Methylen-Bisacrylamid (32,5 : 1)]; 0,5 x TBE
Harnstoff-RNA-Beladungspuffer:	1 x TBE; 7 M Harnstoff; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
10 x <i>Klenow-buffer</i> :	500 mM Tris/HCl (pH 7,2); 100 mM MgSO ₄ ; 1 mM DTT (Promega)
LB-Agar:	1,5 % (w/v) Bactoagar in LB-Medium (Difco-Labs, Detroit, USA)
LB-Medium:	1 % (w/v) Bactotrypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl (Difco-Labs)
L-Glutamin:	200 mM (Sigma-Aldrich)
Luciferase-Substrat:	Canberra-Packard
Lysispuffer (GST-Bakterien):	50 mM Tris (pH 7,8); 0,4 M NaCl; 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (v/v) NP40; [pro 10 ml wurden eine <i>complete</i> -Mini-Tablette (Protease-Inhibitor; Roche Diagnostics) und 50 mM β -Mercaptoethanol frisch zugesetzt]
Lysozym:	10 mg/ml Lysozym (Fluka); 25 mM Tris HCl pH 8,0
10 x <i>Multicore-buffer</i> :	25 mM Tris/Acetat (pH 7,8); 100 mM Kaliumacetat; 10 mM Magnesiumacetat; 1 mM DTT (Promega)
Nuclease-freies Wasser:	Promega
Nucleotidmix:	7,5 µM dATP; 7,5 µM dGTP; 7,5 µM dTTP
1 x PBS:	137 mM NaCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; (pH 7,0 mit NaOH eingestellt)
Penicilin/Streptomycin (100 x):	10.000 U, 10 mg/ml, endotoxinfrei, steril filtriert (PAA-Laboratories, Wien, Österreich)
PPI-Puffer:	20 mM Hepes (pH 7,8); 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl ₂ ; 45 mM DTT; 0,1 % (v/v) NP40; 10 % (v/v) Glycerin
Proteingel-Beladungspuffer:	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8); 20 % (v/v) Glycerin; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 2 % SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Protein-Laufpuffer:	24,8 mM Tris/HCl (pH 8,8); 193 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS
<i>Purification-resin</i> :	Harzsuspension in 7 M Guanidin in HCl (Promega)

<i>Reporter-gene-lysis-buffer:</i>	<i>Reporter-gene-lysis-buffer</i> -Stammlösung (Roche Diagnostics) wurde 1:5 mit dH ₂ O verdünnt
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 0,4 % (v/v) SDS
Sequenzgelbeladungspuffer:	10 mM NaOH; 95 % (w/v) Formamid; 0,05 % (v/v) Bromphenolblau; 0,05 % (v/v) Xylencyanol FF
10 x Stratagene- <i>reaction-buffer</i> :	200 mM Tris/HCl (pH 8,75); 100 mM KCl; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgSO ₄ ; 1 % (v/v) Triton-X 100; 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
8 % Sequenziergellösung:	1 x TBE; 7 M Harnstoff; 8 % (w/v) Acrylamidlösung
TBE (1 x):	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,4 mM EDTA (pH 8,3)
TE-Puffer:	10 mM Tris; 1 mM EDTA (pH 8,3)
5x <i>Transcription-optimized buffer</i> :	200 mM Tris/HCl (pH 7,5); 30 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl; 10 mM Spermidin (Promega)
4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,4 % (v/v) SDS
TSA:	10 ⁻⁴ M Stammlösung (Wako Pure Chemicals)
Trypsin-EDTA (1 x):	0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS (Sigma-Aldrich)
2YT-Medium:	16 g/l Bacto Tryptone, 10 g/l; Bacto Yeast, 5 g/l NaCl (Difco-Labs)

2.1.9. Sequenzierprimer

pGEX-KGK: 5'-AGGTTTTTCACCGTCATCACC-3'

2.1.10 Software

Adobe: Photoshop 3.0

Claris Corporation: MacDrawPro 1.0

Cricket Software: Cricket Graph 1.3.2

Microsoft: Word 6.01; Excel 5.0; Powerpoint 4.0

Raytest: Image Reader 1.4E; Image Gauge 3.01

2.1.11 Zellkulturmaterialien

Alle verwendeten Medien und Zusätze [Glutamin, Penicillin-Streptomycin und fötales Kälberserum (FBS)] sowie Trypsin-EDTA wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die verwendete sterile Plastikware wurde von der Firma Greiner (Solingen) bezogen.

2.1.12 Zelllinien

- Cos-7 Zellen: SV40-transformierte Nierenzellen der grünen Meerkatze (Deutsche Zellkulturbank Braunschweig)
- HeLa Zellen: menschliche Gebärmutterhalskrebszellen (mit freundlichem Dank von Dr. Heinzel, Uni-Frankfurt zu Verfügung gestellt)
- MCF-7 Zellen: humane Brustkrebszellen (ATCC, Rockville, Maryland, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription mittels der T₇-RNA-Polymerase dient dazu, ausgehend von cDNA-Matrizen RNA zu synthetisieren. In einem weiteren Schritt, der Translation, wird ausgehend von der RNA funktionelles Protein hergestellt. Matrizen für die RNA-Synthese können mittels PCR-generierte cDNAs oder linearisierte Plasmide sein. Die Bedingungen, die diese DNA-Matrizen erfüllen müssen, sind die, daß sich im 5'-Bereich der cDNA ein T₇-Promotor befindet und daß die DNA-Matrizen linearisiert vorliegen. Die Linearisierung der DNA-Matrize ist deshalb von Bedeutung, da ein Terminationspunkt benötigt wird. Die Restriktionsschnittstelle muß deshalb so gewählt sein, daß es sich um eine singuläre Restriktionsschnittstelle handelt, die im 3'-Bereich der zu transkribierenden cDNA liegt. Da die verwendeten Rezeptoren alle im pSG5-Vektor kloniert waren (2.1.7.1), konnte die 3' liegende *Xba*I-Schnittstelle verwendet werden. Der Restriktionsansatz sah hier wie folgt aus:

30,0 µg cDNA in pSG5-Plasmid
10,0 µl 10 x Puffer H (Promega)
10,0 µl *Xba* I (10 U/µl)
ad 100 µl dH₂O

Der Restriktionsansatz wurde für 1,5 - 2,0 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die DNA über Säulen (WizardTM Plus *Miniprep* DNA *Purification*) aufgereinigt.

a) Aufreinigung von DNA-Matrizen

Das Aufreinigen der DNA-Matrizen dient dazu, diese Nuclease-frei zu bekommen. Hierzu wurde der Restriktionsansatz (DNA-Konzentration 0,3 µg/µl) mit 1 ml *Purification-Resin* gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Säulen (WizardTM Plus *Miniprep* DNA *Purification*) gefüllt und über eine Vakuum-Absaugvorrichtung (*Vac-Man*, Promega) über die Säulen gesaugt. Die an das *Resin*

gebundene DNA wurde mit 2 ml *Column wash solution I* und 1 ml *Column wash solution II* gewaschen. Anschließend wurde der auf den Säulen verbliebene Alkohol mittels Zentrifugation (2 min, 20.000 g) entfernt und die DNA nach Zugabe von 100 µl Nuclease-freiem Wasser durch erneutes Zentrifugieren (2 min, 20.000 g) eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft.

b) Transkriptionsansätze

Da bei der Transkription RNA synthetisiert wird, ist hierbei auf RNase-freies Arbeiten zu achten. Die Ansätze sahen wie folgt aus:

10,0	µl	5 x <i>Transcription-optimized-buffer</i>
5,0	µl	100 mM DTT
5,0	µl	5 mM rNTPs
2,5	µl	<i>Ribonuclease Inhibitor</i> (RNAsin, 40 U/µl)
2,5	µl	T ₇ -RNA-Polymerase (10-20 U/µl)
2,0	µg	Nuclease-freie DNA-Matrize

ad 50 µl dH₂O

Die Transkriptionsansätze wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Quantität und Qualität der RNA auf einem 8 %igem denaturierenden Sequenzgel überprüft. Nach einem Vorlauf von 1 Stunde bei 15 Watt in 1 x TBE (vertikale Gelkammern V15-17) wurden je 5 µl jedes Transkriptionsansatzes mit 8 µl *Urea-loading-buffer* versetzt und 1 Stunde bei 20 Watt im Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem 1 x TBE-Ethidiumbromid-Bad (Ethidiumbromid-Konzentration 1,0 µg/ml) 15 min gefärbt. Unter UV-Strahlung konnte die RNA-Menge, im Vergleich zu einer Referenz, abgeschätzt und ihre Qualität überprüft werden.

2.2.1.2 *In vitro* Translation

Aus transkribierter RNA kann mit Hilfe der *in vitro* Translation funktionelles Protein synthetisiert werden. Die Translation erfolgt nach dem Protokoll der Firma Promega, wobei jedoch die eingesetzte RNA-Menge je nach Qualität und/oder Quantität der RNA variieren kann:

35,0	µl	Kaninchen- <i>Reticulocytenlysate</i> (Nuclease behandelt)
10,5	µl	Nuclease-freies Wasser
1,0	µl	1 mM Aminosäure-Mix
1,0	µl	RNAsin (40 U/µl)
2,5	µl	RNA

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 30 °C inkubiert und konnte anschließend für die weiteren Experimente eingesetzt werden. Für Untersuchungen, bei denen radioaktiv-markiertes Protein benötigt wurde, wurde zu dem obigen Translationsansatz zusätzlich noch [³⁵S]-markiertes Methionin gegeben. Bei diesen Ansätzen wurde dann ein Aminosäure-Mix verwendet, der kein Methionin enthielt.

2.2.1.3 *Gelshift-Assay*

Diese Methode untersucht die sequenzspezifische Bindung von nukleären Rezeptoren an verschiedene doppelsträngige DNA-Fragmente *in vitro*. Die Methode basiert auf der Verminderung der elektrophoretischen Mobilität von Protein-DNA-Komplexen gegenüber freien DNA-Molekülen („*shift*“ des Komplexes). Um diese Protein-DNA-Komplexe sichtbar machen zu können, werden radioaktiv-markierte doppelsträngige Oligonucleotide verwendet und mit *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert. Die Trennung der Protein-DNA-Komplexe von den freien Oligonucleotiden erfolgt elektrophoretisch in nativen Polyacrylamidgelen.

a) *Annealing* von Oligonucleotiden

Äquimolare Mengen eines Oligonucleotids mit dem zu untersuchenden DNA-Bindemotiv (VDRE) und ein kürzerer *antisense-Primer* wurden in einem Reaktionsansatz mit *Multicore-buffer* und dH₂O für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Das doppelsträngige Oligonucleotid wurde auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt.

b) Klenow-Auffüllreaktion — Markierung von DNA mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP

Die Markierung der Oligonucleotide erfolgte mittels einer Klenow-*fill-in*-Reaktion, wobei die Oligonucleotide mit [^{32}P]-dCTP endmarkiert wurden.

Zur Markierung von Oligonucleotiden wurde folgender Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert:

2,0	μl	10 x Klenow-Puffer (Promega)
2,0	μl	dA/dC/dT Nucleotide (10 mM)
3,0	μl	doppelsträngiges Oligonucleotid (50 ng/ μl)
1,0	μl	[^{32}P]-dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
11,0	μl	dH ₂ O
1,0	μl	Klenow DNA-Polymerase (5 U/ μl)

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die markierte DNA mit Hilfe von Säulen (Mini Quick Spin™ Oligo Column, Roche Diagnostics) von den freien, nicht eingebauten Nucleotiden getrennt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz auf eine Säule gegeben und 5 min bei 1.000 g zentrifugiert, wodurch das markierte Oligonucleotid eluiert wurde. Die freien Nucleotide verbleiben in der Säulen-Matrix. Nach der Elution wurde die Konzentration der DNA mit TE-Puffer auf 1 ng/ μl eingestellt. Bei dieser Konzentration entsprechen 1 μl radioaktivem Oligonucleotid etwa 50.000 cpm.

c) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden unter nicht-denaturierenden Bedingungen Protein-DNA-Komplexe von ungebundener DNA getrennt. 8 %ige native Polyacrylamidgele setzen sich wie folgt zusammen:

50,0	ml	8 %ige <i>Gelshift</i> -Stammlösung
250,0	μl	25 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
25,0	μl	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)

Nach der Polymerisation der Gele wurden sie luftblasenfrei in eine Gelapparatur (V15-17) eingespannt und der Vorlauf erfolgte eine Stunde bei 200 V in 0,5 x TBE-Laufpuffer. Anschließend wurden die Gele mit den Proben der verschiedenen *Gelshift-Assays* beladen.

d) Gelshift-Assay

Der Ansatz zur Untersuchung der Bindung des VDR-RXR-Heterodimers an verschiedene VDREs sah wie folgt aus:

2,5	µl	<i>in vitro</i> translaterter VDR
2,5	µl	<i>in vitro</i> translaterter RXR
4,0	µl	5 x <i>Gelshift-buffer</i>
2,5	µl	1 M KCl
5,5	µl	dH ₂ O

Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, bevor 2,0 µl Ligand (oder DMSO) hinzugegeben wurde und die Inkubation 15 min fortgesetzt wurde. Anschließend wurde 1 µl [³²P]-markiertes doppelsträngiges Oligonucleotid hinzugegeben (Konzentration 1 ng/µl) und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden nach Beendigung der Inkubationszeit auf native 8-%ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen (siehe 2.2.1.3c). Die Trennung der Protein-DNA-Komplexe von freien Oligonucleotiden erfolgte für 105 min bei 200 V. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele auf Whatmanpapier transferiert und im Vakuum-Geltrockner für 90 min bei 80 °C getrocknet. Anschließend erfolgte eine Exposition der Gele auf einem BAS-MP Phosphor-*Imager-Screen* über Nacht. Die Menge von Protein-DNA-Komplexen in Relation zum freien Oligonucleotid wurde nach Einlesen der *Screens* im *Bioimager* FLA-2000 mit Hilfe der *Image Gauge* Software quantifiziert.

e) Supershift-Assay

Beim *Supershift-Assay* kann die Ligand-abhängige Interaktion von Kofaktoren mit VDR-RXR-VDRE-Komplexen untersucht werden. Diese Interaktionen werden dadurch deutlich, daß der quartäre Komplex aus VDR, RXR, VDRE und Kofaktor noch geringere elektrophoretische Mobilität im nativen Polyacrylamidgel aufweist als der ternäre Komplex und es dadurch zu einem „*supershift*“ der DNA-Bande kommt. Für diese Untersuchung wurden die Ansätze nach dem unter 2.2.1.3d beschriebenen Protokoll inkubiert und im Anschluß an die Inkubation mit Ligand wurden 3,0 µl bakteriell-exprimierter Kofaktor (Protein-Konzentration 1,0 µg/µl) hinzugegeben, woraufhin die Inkubation 10 min fortgesetzt wurde. Dann wurde 1,0 µl der radioaktiv-markierten DNA hinzugegeben und wie unter (2.2.1.3d) beschrieben weitere 20 min inkubiert, bevor die Proben auf native Polyacrylamidgele aufgeladen und elektrophoretisch aufgetrennt

wurden. Das Trocknen und Exponieren der Gele erfolgte wie unter (2.2.1.3d) beschrieben.

2.2.1.4 Limitierter Proteaseverdau (LPD)

a) LPD mit monomeren Rezeptor-Proteinen

Beim limitierten Proteaseverdau (LPD, vom englischen *limited protease digestion Assay*) handelt es sich um eine *in vitro* Untersuchungsmethode, bei der Ligand-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors analysiert werden können. Beim LPD wird *in vitro* translatierter, [³⁵S]-Methionin markierter Rezeptor mit einer Endoprotease (z.B. Trypsin) partiell verdaut. Ein vollständiger Abbau des Rezeptors durch die Endoprotease wird durch die Interaktion des Rezeptors mit seinen spezifischen Liganden verhindert. Die Protease-resistenten Proteinfragmente werden als funktionelle Konformationen des nukleären Rezeptors interpretiert. Der LPD mit monomeren Rezeptor-Proteinen wurde wie folgt durchgeführt:

2,5	µl	<i>in vitro</i> translatierter, [³⁵ S]-Methionin markierter Rezeptor
2,5	µl	unprogrammiertes Lysat
4,0	µl	5 x <i>Gelshift-buffer</i>
2,5	µl	1 M KCl
2,0	µl	Ligand (oder DMSO)

ad 20 µl dH₂O

Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4,0 µl Trypsinlösung hinzugegeben und der Ansatz wurde für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die eingesetzte Proteasemenge entspricht einer finalen Trypsinkonzentration von 8,3 µg/µl. Anschließend wurde der Proteaseverdau durch Zugabe von 25 µl Proteingel-Beladungspuffer und 3 min Denaturierung bei 85 °C beendet. Die Auftrennung der Proteinfragmente erfolgte auf 15 % denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (siehe 2.2.1.4d). Die Quantifizierung der Proteinfragmente erfolgte mit Hilfe der *Image-Gauge* Software, nachdem die Gele auf BAS-MP *Imager-Screens* exponiert und im *Bioimager* eingelesen worden waren.

b) LPD mit DNA komplexierten Heterodimeren

Der LPD mit DNA komplexierten Heterodimeren stellt eine Weiterentwicklung des LPDs mit monomeren Rezeptor-Proteinen dar, da er mehr an die *in vivo* Situation angepaßt ist. Der Reaktionsansatz sah hierbei wie folgt aus:

2,5	µl	<i>in vitro</i> translatierter, [³⁵ S]-Methionin markierter VDR
2,5	µl	<i>in vitro</i> translatierter RXR
4,0	µl	5 x <i>Gelshift-buffer</i>
2,5	µl	1 M KCl
5,5	µl	dH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert, bevor 2,0 µl Ligand (oder DMSO) hinzugegeben und die Inkubation für 15 min fortgesetzt wurde. Anschließend wurde 1 µl doppelsträngiges, nicht radioaktiv-markiertes Oligonucleotid (1 ng/µl), welches ein VDRE enthielt, zugesetzt und für weitere 20 min inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 4,0 µl Trypsinlösung (finale Konzentration 8,3 µg/µl) gegeben. Die Proben wurden im weiteren Verlauf wie unter (2.2.1.4a) beschrieben behandelt. Auch die Auswertung verlief analog dazu.

c) LPD von VDR-RXR-VDRE-Kofaktor-Komplexen

Der LPD von VDR-RXR-VDRE-Kofaktor-Komplexen unterscheidet sich vom LPD mit monomeren Rezeptor-Proteinen und dem LPD von DNA-komplexierten Heterodimeren dadurch, daß dem Inkubationsansatz außerdem Kofaktor hinzugegeben wurde. Der Ansatz sah dabei wie folgt aus:

2,5	µl	<i>in vitro</i> translatierter, [³⁵ S]-Methionin markierter VDR
2,5	µl	<i>in vitro</i> translatierter RXR
4,0	µl	5 x <i>Gelshift-buffer</i>
2,5	µl	1 M KCl
0,5	µl	dH ₂ O

Es erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei RT und anschließend wurden 5,0 µl bakteriell-exprimiertes Kofaktor-Protein (1 µg/µl) zugegeben, wonach die Inkubation um weitere 30 min verlängert wurde. Die weiteren Schritte (Zugabe von Ligand und DNA) sowie die Inkubationszeiten erfolgten wie unter (2.2.1.4a) beschrieben.

d) Proteintrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteintrennung in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt nach dem Masse/Ladungsverhältnis der einzelnen Proteine. Für die Proteintrennung wurden Gele mit 15 % Trenngele und 3,6 % Sammelgele verwendet. Die Zähne der verwendeten Kämme ergaben Geltasche mit einem Ladevolumen von 60 µl. Die Gele wurden in Protein-Laufpuffer eine Stunde bei 15 Watt vorlaufen gelassen, bevor die Proben auf ein Gel aufgetragen wurden. Nach dem Auftragen wurden die Proben eine Stunde bei 5 Watt ins Sammelgel einlaufen gelassen. Anschließend erfolgte die Proteintrennung für 2,5 Stunden bei 15 Watt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Trenngel auf Whatmanpapier transferiert und im Geltrockner zwei Stunden bei 80 °C getrocknet, wobei ein Temperaturanstieg von 1 °C pro Minute eingestellt wurde, um ein Reißen der Gele zu verhindern.

Trenngel (15 %):

15,0	ml	40 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung
10,0	ml	4 x Trenngelpuffer
15,0	ml	dH ₂ O
200,0	µl	25 % (w/v) APS
20,0	µl	TEMED

Sammelgel (3,6 %):

1,8	ml	40 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung
5,0	ml	4 x Sammelgelpuffer
13,2	ml	dH ₂ O
100,0	µl	25 % (w/v) APS
10,0	µl	TEMED

2.2.1.5 PCR zur Erzeugung von C- und N-terminal verkürzten Koaktivator-Proteinen

Um N- und C-terminal verkürzte Proteine zu erzeugen, wird mittels PCR ein Teilbereich der entsprechenden Plasmid-DNA amplifiziert. Die eingesetzten *Primer* (siehe Tabelle 2.1.7.2) enthalten im *sense-Primer* jeweils zusätzlich zur entsprechenden Konsensus-Sequenz den Promotor der T₇-RNA-Polymerase sowie ein Start-Kodon. Dies ist nötig,

um die erzeugte DNA-Matrize anschließend für die Transkription und Translation (2.1.7.1) verwenden zu können. Der Ansatz für die PCR sah wie folgt aus:

5,0	µl	10 x Taq-Polymerase-Puffer (Life Technologies)
1,5	µl	50 mM MgCl ₂
5,0	µl	Plasmid-DNA
1,0	µl	10 mM dNTP
1,0	µl	<i>sense-Primer</i> (20 pmol/µl)
1,0	µl	<i>antisense-Primer</i> (20 pmol/µl)
0,5	µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
35,0	µl	dH ₂ O

Das PCR-Profil sah wie folgt aus:

1 x 4 min 94 °C
35 x 0,5 min 94 °C, 1 min 60 °C und 1,5 min 72 °C

Nach Beendigung der PCR wird ein Aliquot des PCR-Ansatzes auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Erhalt von Banden der entsprechenden Fragment-Größe wurde der gesamte PCR-Ansatz RNase frei aufgereinigt (siehe 2.2.1.1a). Die DNA konnte direkt für die *in vitro* Transkription und Translation (2.1.7.1) eingesetzt werden.

2.2.1.6 Klonierung von GST-Fusionsproteinen mit C- und N-terminal verkürzten Kofaktor-Proteinen

Protein-Protein-Interaktionen zwischen Kofaktoren und nukleären Rezeptoren lassen sich *in vitro* im GST-Pulldown nachweisen. Hierfür wurden die verkürzte DNA-Matrizen der Kofaktoren, die mittels PCR amplifiziert worden waren, in den Vektor pGEX-KGK kloniert. Der einzige Unterschied zu dem oben beschriebenen Ansatz (2.2.1.5) bestand in den verwendeten *Primern*. Die bei der Klonierung verwendeten *Primer* (siehe Tabelle 2.1.7.3) wiesen anstelle der T₇-RNA-Polymerase Konsensussequenz, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme auf. Nach Beendigung der PCR wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt und mit Restriktionsenzymen (*HindIII* und *BamHI*) geschnitten, ebenso wie der Vektor pGEX-KGK. Vom Vektor und den PCR-DNA-Fragmenten wurden 30 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl geschnitten. Die Restriktion wurde auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft. Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung des Vektors.

a) Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Um die Möglichkeit einer Vektor-Religationen bei der Ligation zu vermindern, wurde der Vektor dephosphoryliert. Der Ansatz sah wie folgt aus:

30 µg *HindIII/BamHI* geschnittener Vektor pGEX-KGK
20 µl 10 x Phosphatase-Puffer (Roche Diagnostics)
20 µl *Shrimp*-Alkalische-Phosphatase (1 U/µl)
ad 200 µl dH₂O

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Dephosphorylierungs-Ansatz und das geschnittene PCR-Fragment mittels Elektrophorese durch ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe des DNA-Gel-Extraktions-Kits aufgereinigt. Hierzu wurden die Vektorbande sowie die Bande des PCR-Fragmentes aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosegel wurde in ethanolischem Puffer geschmolzen und die Proben mittels einer Vakuum-Absaugvorrichtung (*Vac-Man*, Promega) über Säulen gesaugt, wobei die DNA an die Säulen-Matrix gebunden wurde. Nach Waschungen mit ethanolischen Puffern wurden die Säulen für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert, um Pufferreste von der Säule zu entfernen. Durch Zugabe von 50 µl Nuclease-freiem Wasser und erneuter Zentrifugation für 1 min bei 10.000 g wurden die DNA-Fragmente von der Säule eluiert. Die DNA-Konzentration wurde nach der Extraktion erneut auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft und anschließend wurden die DNA-Fragmente für die Ligation eingesetzt.

b) Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente zu einem Plasmid zusammengefügt. Folgender Ansatz wurde hierzu über Nacht bei 16 °C inkubiert:

1,0 µl T₄-DNA-Ligase-Puffer
1,0 µl T₄-DNA-Ligase (4 U/µl)
0,1 µg geschnittener, dephosphorylierter und aufgereinigter Vektor pGEX-KGK
0,5 µg geschnittenes und aufgereinigtes PCR-DNA-Fragment
ad 10 µl dH₂O

Zur Kontrolle wurde auch ein Ansatz ohne PCR-DNA-Fragment angesetzt, um den Erfolg der Dephosphorylierung zu überprüfen. Dephosphorylierte DNA-Fragment sollten nicht religieren.

c) Transformation in kompetente Epicurian XL1-Blue Zellen

100 µl Epicurian XL1-Blue *supercompetent cells* wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit β-Mercaptoethanol (End-Konzentration 100 mM) versetzt und 10 min auf Eis in 15 ml Falcon Gefäßen (Greiner) inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatz dazugegeben und die Inkubation wurde für 30 min fortgeführt. Die Zellen wurden für 45 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien wurden 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Hälfte des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

d) Präparation von Plasmid-DNA im Mini- oder Maxi-Maßstab

Für die Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Für eine Präparation von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurden 250 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler (200 rpm) bei 37 °C inkubiert.

Beide Formen der Plasmid-Präparation (Mini- und Maxi-Präparation) erfolgten mittels der Silicagel-Methode nach dem Protokoll der Firma Promega. Hierbei erfolgt zunächst eine alkalische Lyse der Bakterien, an deren Anschluß die Proben zentrifugiert (10 min, 4.000 g, 4 °C) wurden. Aus dem Überstand nach der Zentrifugation wurde bei der Maxi-Präparation durch Zugabe von Isopropanol die darin enthaltene Plasmid-DNA gefällt, bevor sie in TE-Puffer rückgelöst und über Silicagel-Säulen gegeben wurde. Bei der Präparation im Mini-Maßstab ist eine Präzipitation der DNA nicht nötig, der Überstand wurde nach der alkalischen Lyse direkt auf die Silicagel-Säulen gegeben. Die Proben wurden mit Hilfe einer Vakuum-Absaugvorrichtung (*Vac-Man*, Promega) über Säulen gesaugt, wobei die DNA an das Säulen-Material gebunden wurde. Nach Waschungen der Proben mit *Column wash solution I* und *Column wash solution II* wurden die Säulen zentrifugiert (2 min, 3.000 g), um Pufferreste zu entfernen und anschließend nach Zugabe

von TE-Puffer zur Elution der DNA erneut zentrifugiert (2 min 3.000 g). Die DNA-Konzentration wurde auf 1 %igen Agarosegelen überprüft.

2.2.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Didesoxyverfahren [135] unter der Verwendung von sequenzspezifischen *Primern*. Bei diesem Verfahren wird enzymatisch ein komplementärer Strang zu der zu analysierenden Sequenz gebildet. Hierzu werden vier Reaktionsgemische angesetzt, die jeweils alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate enthalten und außerdem zusätzlich jeweils eines der vier als Didesoxyribonucleosidtriphosphat (ddNTP). Den ddNTPs fehlt sowohl die 2'- als auch die 3'-Hydroxylgruppe, wodurch ein Einbau eines ddNTPs zum Kettenabbruch der DNA-Polymerase führt. Durch die Verwendung von dNTPs und ddNTPs entstehen in jedem der vier Reaktionsansätze unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Durch Verwendung von radioaktiven [³²P]-dCTP können nach der Auftrennung der einzelnen Reaktionsansätze die Strangbrüche sichtbar bzw. lesbar gemacht werden.

Um die Sequenzreaktion durchführen zu können, mußte die Plasmid-DNA zunächst denaturiert werden. Hierzu wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 2 µl 10 M NaOH versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte DNA mit zwei Volumen 100 % Ethanol gefällt und in 8,0 µl dH₂O resuspendiert und mit 1,0 µl *Multicore-buffer* sowie 1,0 µl des Sequenzierprimers (200 ng/µl) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 70 °C im Heizblock für 5 min inkubiert und anschließend für 30 - 60 min auf RT abkühlen gelassen. Die *Annealing*-Ansätzen wurden wie folgt weiterbehandelt:

0,5 µl	Nucleotid-Mix
0,5 µl	100 mM DTT
0,3 µl	[³² P]-dCTP (10 µCi/µl)
0,3 µl	T ₇ -DNA-Polymerase (ca. 10 U/µl)
1,0 µl	<i>Enzyme-dilution-buffer</i>

Die Ansätze wurden auf vier Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt, in denen sich je 2,5 µl eines der ddNTPs-Abbruchmische befanden. Die Terminationsreaktion wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 4,0 µl Sequenzgelbeladungspuffer abgebrochen wurde. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und direkt auf ein 8 %iges Sequenzgel aufgeladen.

a) Sequenzgel

Für die Herstellung eines Sequenzgels wurden zwei Glasplatten (42 cm x 33 cm und 39 cm x 33 cm) gereinigt und mit 5 ml Repell-Silan (Amersham-Pharmacia) eingerieben. Die Glasplatten wurden durch 0,4 mm *Spacern* getrennt. Anschließend wurden 80 ml einer 8 %igen Sequenziergellösung mit 250 µl 25 % (w/v) APS und 25 µl TEMED gemischt und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Die glatte Seite der Haifischzahnkämme wurde zwischen die Platten geklemmt, damit eine Tasche entstand. Nach der Polymerisation wurden die Gele in vertikale Gelelektrophorese-Kammern (Modell 25, Life Technologies) eingespannt und in 1 x TBE etwa 1 Stunde bei 75 Watt einlaufen gelassen. Zum Beladen der Proben wurden die Haifischzahnkämme mit den Zacken nach unten in die Tasche gesteckt, so daß je 24 kleine Taschen entstanden, die dann mit 5,0 µl der Proben aus der Sequenzreaktion beladen wurden. Die Sequenzreaktionsprodukte wurden 1,5 - 2,0 Stunden bei 75 Watt aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Glasplatte entfernt und das Gel wurde auf Whatman-Papier transferriert und im Vakuum-Geltrockner 1 Stunde bei 80 °C getrocknet. Die Audiographie erfolgte 0,5 - 1,0 Stunden auf einem Phosphor-*Imager-Screen*. Anschließend wurden die *Screens* im *Bioimager* eingelesen.

2.2.1.8 Bakterielle Protein-Expression

Die bakterielle Protein-Expression ermöglicht es, relativ hohe Mengen eines Proteins zu erhalten (µg - mg Bereich). Es gibt mehrere Systeme, die eine bakterielle Protein-Expression ermöglichen. Das hier verwendete Glutathion-S-Transferase System (GST) ist eines davon. Das Prinzip basiert auf der Interaktion des Enzyms Glutathion-S-Transferase mit Glutathion, welches bei diesem System an *Beads* gekoppelt vorliegt. Beim GST-System wird die cDNA des gewünschten Proteins in ein Expressionsplasmid (pGEX-KGK) im Leseraster hinter die cDNA des Glutathion-S-Transferasegens kloniert. Das Expressionsplasmid steht unter der Kontrolle des Lac-Z-Promotors, wodurch eine gesteuerte Genexpression nach Induktion mit Isopropyl-*-D-thio-galactopyranodid* (IPTG) und somit eine Expression des Fusionsproteins ermöglicht wird. Anschließend kann das Fusionsprotein aufgereinigt werden, indem es über die GST an Glutathion-Sepharose-*Beads* gekoppelt wird. Um eine hohe Fusionsprotein-Konzentration zu erhalten, sind vier Parameter von entscheidendem Einfluß: die Optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakteriensuspension zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG, die IPTG-Konzentration, die Inkubationstemperatur nach Induktion mit IPTG und die Inkubationsdauer nach

Zugabe von IPTG. Die bakterielle Protein-Expression erfolgt nach dem folgendem Protokoll:

Die DNA-Konstrukte der Fusionsproteine wurden in BL21(DE3)pLysS Zellen transformiert und auf LB-Platten (100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Chloramphenicol) selektioniert. 50 ml 2YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft und über Nacht schüttelnd (200 rpm) bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 400 ml 2YT-Medium mit 5 ml der Übernachtskultursuspension versetzt. Hierbei wurde die Antibiotika-Konzentration halbiert (50 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Chloramphenicol), um die Verdopplungsrate der Bakterien zu erhöhen. Die Inkubation wurde bei 200 rpm und der in **Tab. 6** angegebenen Temperatur auf dem Schüttler fortgesetzt.

Für die verwendeten Konstrukte wurden folgende Induktions-Parameter verwendet:

GST-Konstrukt	OD₆₀₀	[IPTG]	Temperatur	Inkubationszeit
GST-VDR	0,3	0,25 mM	30 °C	3 h
GST-SRC-1 ₅₉₆₋₇₉₀	0,3	0,25 mM	37 °C	3 h
GST-TIF2 ₆₄₆₋₉₂₆	0,3	0,25 mM	37 °C	3 h
GST-RAC3 ₆₇₃₋₁₁₀₆	0,3	0,25 mM	37 °C	3 h
GST NCoR ₂₂₁₈₋₂₄₅₃	0,8	1,25 mM	25 °C	5 h
GST NCoR ₁₆₇₉₋₂₄₅₃	0,8	1,25 mM	25 °C	5 h

Tab. 6: Inkubations-Parameter. In der Tabelle sind die Inkubations-Parameter für die verwendeten GST-Fusionsproteine zusammengestellt.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Bakteriensuspensionen abzentrifugiert (10 min, 4.000 g, 4 °C) und bei - 80 °C eingefroren.

a) Protein-Aufreinigung

Zu dem Bakterien-Pellet einer 400 ml-Kultur, wurden 1,5 ml Lysis-Puffer gegeben. Die Bakterien wurden resuspendiert und anschließend mit Triton-X 100 versetzt (End-Konzentration 2 %). Der verwendete Bakterienstamm verfügt über ein zusätzliches Resistenz-Plasmid (Selektionmarker Chloramphenicol), das ein Lysozym-Gen kodiert. Lysozym erleichtert den Aufschluß der Bakterien. Wenn die Bakterien sich trotzdem schwer aufschließen ließen, wurde zusätzlich Lysozym hinzugegeben (End-Konzentration 1-5 mg/ml). Die Proben wurden zentrifugiert (20 min, 27.000 g, 4 °C) und der Überstand mit 10 % - 20 % (v/v) einer 50 %igen (v/v) GST-Sepharose-*Bead*-Mischung versetzt und

30 min bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 1.000 g, RT), mit 10 ml PBS versetzt und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben so eingestellt, daß ein Puffer/*Bead*-Verhältnis von 1:1 vorlag. Nach Abschätzung der Protein-Konzentration auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden die GST-Proteine bei 4 °C gelagert und für *GST-Pulldown Assays* und *Supershift*-Experimente eingesetzt.

b) Herstellung einer 50 %igen (v/v) GST-Sepharose-*Bead*-Mischung

Zur Herstellung von 1,0 ml einer 50 %ige GST-Sepharose-*Bead*-Mischung, wurden 1,3 ml der GST-Sepharose-*Beads* sedimentiert (5 min, 1.000 g, RT) einmal mit 10 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit PBS so eingestellt, daß ein *Bead*/Puffer-Verhältnis von 1:1 entstand.

2.2.1.9 GST-*Pulldown Assay*

Beim *GST-Pulldown Assay* können *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden wie zum Beispiel die Interaktion des GST-VDR Fusionsproteins mit Kofaktoren. Hierzu wurden bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine, die mittels ihres Gluthation-S-Transferase Proteinanteils an Gluthation-Sepharose-*Beads* gekoppelt sind, verwendet. Die Vorinkubation sah wie folgt aus:

5,0	µl	<i>in vitro</i> translatiertes, [³⁵ S]-Methionin-markiertes Protein
13,0	µl	PPI-Puffer
2,0	µl	Ligand (oder Ethanol)

Der Ansatz wurden 15 min bei RT vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurden die an *Beads* gekoppelten GST-Fusionsproteine mit BSA gesättigt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Hierzu wurde der Puffer von den *Beads* abgenommen und durch PBS/BSA (1,0 mg BSA/ml) ersetzt. Die GST-Fusionsproteine wurden 20 min bei RT auf einem Vertikal-Rotor inkubiert. Anschließend wurde mit der Vorinkubation wie folgt weiter verfahren:

20,0	µl	vorinkubierter Reaktionsansatz
22,0	µl	PPI-Puffer
50,0	µl	BSA-gesättigte GST-Fusionsproteine an <i>Beads</i> gekoppelt
8,0	µl	Ligand (oder Ethanol)

Der Gesamtansatz wurde zunächst für 20 min bei 30 °C und anschließend für 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 900 µl PPI-Puffer versetzt, gemischt (5 s, 2.000 rpm auf einem Vortex) und zentrifugiert (10 s bei 20.000 g, RT). Der Überstand verworfen und die Proben wurden anschließend noch zwei weitere Male mit je 1 ml PPI-Puffer gewaschen. Nach der letzten Waschung wurde der Überstand erneut abgenommen und die Proben wurden mit 25 µl Protein-Beladungspuffer versetzt und für 3 min bei 85 °C denaturiert. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 20.000 g, RT) und der Überstand auf 10 %igen denaturierenden SDS-Acrylamidgelen in Mini-Gelelektrophorese-Kammern aufgetrennt.

Trenngel (10 %) für Mini-Gelelektrophorese:

10,0	ml	dH ₂ O
5,0	ml	40 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung
5,0	ml	4 x Trenngel-Puffer
100,0	µl	25 % (w/v) APS
10,0	µl	TEMED

Sammelgel (3,6 %) für Mini-Gelelektrophorese:

6,0	ml	dH ₂ O
1,2	ml	40 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung
2,5	ml	4 x Sammelgel-Puffer
150,0	µl	25 % (w/v) APS
15,0	µl	TEMED

2.2.1.10 Quantifizierung mit dem *Bioimager* (FLA-2000)

Zur Quantifizierung von radioaktiven Signalen wurde ein Bioimager FLA-2000 genutzt. Dazu wurden die radioaktiven Gele über Nacht auf einem BAS-MP Phosphor-*Imager-Screen* exponiert. Diese *Imager-Screens* sind mit einer Phosphorverbindung beschichtete Folien, bei denen die Elektronen durch die β -Strahlung auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Die Anhebung der Elektronen auf ein höheres Energieniveau erfolgt

proportional zur Intensität der Strahlung. Wird der *Screen* im *Bioimager* eingelesen, werden die angehobenen Elektronen durch einen Laser wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau gebracht. Die Energiedifferenz zwischen dem angeregten und dem normalen Niveau wird als Lichtemission frei und kann durch den *Bioimager* detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Die Signale werden anschließend mit dem Programm *Image Gauge 3.01* densitometrisch ausgewertet. Mittels Bestrahlung mit Weißlicht werden die Restsignale auf den Phosphor-*Imager-Screen* gelöscht, wodurch der *Screen* fast unbegrenzt häufig wiederverwendet werden kann.

2.2.2 Zellbiologische Methoden - *in vivo* Untersuchungen

2.2.2.1 Kulturbedingungen für Cos-7, MCF-7 und HeLa-Zelllinien

Die Zellen wurden unter den unten angegebenen Bedingungen (**Tab. 7**) in Kulturflaschen (175 cm², mit Sterilfilter) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sobald diese konfluent mit Zellen bewachsen waren, wurden die Zellen trypsinisiert und verdünnt in neue Flaschen, bzw. für einen Reportergen-Assay in 6-Well-Platten, ausgesät.

Bedingungen	Cos-7	MCF-7	HeLa
Trypsinmenge	2 ml/Kulturflasche	1,5 ml/Kulturflasche	1,5 ml/Kulturflasche
Trypsinierungsbedingung	10 min, 37 °C,	5 min, RT	5 min, 37 °C
Medium	DMEM	DMEM	DMEM
Supplementation	2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 10 % (w/v) FBS	2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 10 % (w/v) FBS	2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin 10 % (w/v) FBS
Inkubation	37 °C; 5 % CO ₂	37 °C; 5 % CO ₂	37 °C; 5 % CO ₂
Verdopplungsrate	1-2 Tage	2 Tage	0,5 Tage

Tab. 7: Kulturbedingungen. Die Tabelle gibt die Kulturbedingungen der verschiedenen verwendeten Zelllinien an.

2.2.2.2 Reporter-gen-Assay in Cos-7, MCF-7 und HeLa Zellen

Beim Reporter-gen-Assay handelt es sich um eine "in vivo" Untersuchungsmethode, bei der der Einfluß des zellulären Milieus auf die Verhaltensweise eines Rezeptors untersucht werden kann. Mittels einer transienten Transfektion werden die zu untersuchenden nukleären Rezeptoren und Kofaktoren zusammen mit einem Reporter-gen-Konstrukt in Zellen überexprimiert. Untersucht wird die Ligand-induzierte Aktivierung des Reporter-gens. Zwei verschiedene Reporter-gen-Assays wurden verwendet, zum einen der traditionelle Luciferase-Reporter-gen-Assay und zum anderen der *Mammalian-One-Hybrid-Assay*. Beim Luciferase-Reporter-gen-Assay werden die Zellen mit Expressionvektoren für VDR und RXR transfiziert. Das Luciferase-Reporter-gen-Konstrukt enthält ein VDRE, welches im Vektor pGL2 (Promega) in vier Kopien vor den *tk*-Promotor und des LUC-Reporter-gen kloniert wurde (s. Abb. 2.1.7.4). Die Aktivierung des Reporter-gens erfolgt demnach durch Ligand-abhängige Bindung des heterodimeren Protein-Komplexes an das VDRE. Beim *Mammalian-One-Hybrid-Assay* enthält das Reporter-gen-Konstrukt hingegen kein VDRE sondern drei Kopien einer Gal4-Bindestellen. Der Expressionsvektor besteht aus einer Gal4-DBD hinter die die LBD des VDR kloniert wurde. Die Ligand-abhängige Aktivierung des Reporter-gens erfolgt über Bindung an die VDR-LBD, die die Interaktion der Gal4-DBD mit der Gal4-Bindestelle stabilisiert.

Die Bindung des Liganden an den VDR stabilisiert in beiden Assays eine Interaktion der DBD mit dem DNA-Bindemotiv und initiiert die Transkription des Luciferase-Reporter-gens. Die Enzymaktivität der gebildeten Luciferase kann luminometrisch bestimmt werden, da das Enzym in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luciferin umsetzt. Hierbei kommt es zur Lichtemission. Die gemessene Signalstärke ist proportional zur Proteinmenge. Als Referenz für die Transfektionseffizienz wird ein Referenzplasmid (pCH110) co-transfiziert, welches ein β -Galactosidasegen kodiert. Durch die Cotransfektion des β -Galactosidasegen wird es möglich, die Signalstärke der Luciferase-Messung zu quantifizieren. Bei Zelllinien mit einer sehr hohen eigenen β -Galactosidase-Expression kann auch eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und zur Normierung verwendet werden.

Cos-7, MCF-7 oder HeLa Zellen wurden in Phenolrot-freiem DMEM (*Dulbecos modified Eagles medium*) aufgenommen und in 6-Well-Platten mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml ausgesät. Das Medium enthielt 10 % (w/v) FBS, welches zuvor über 10 % (w/v) Aktivkohle gereinigt wurde, um lipophile Komponenten wie z.B. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu entfernen. Zur Supplementation wurde dem Medium außerdem 2 mM L-Glutamin und jeweils 100 U/ml Penicilin und Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden über Nacht im

Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion (**Tab. 8**) erfolgt am darauf folgenden Tag:

Reporter-Gen-Assay in Cos-7 und MCF-7 Zellen	Mammalian-One-Hybrid-Assay in HeLa Zellen
1 µg pCH110	1 µg (Gal4)- <i>tk</i> -Luc
1 µg pSG5-VDR	1 µg Gal4 _{DBD} -VDR _{LD}
1 µg pSG5-RXR	
1 µg pGL2 Reporterplasmid	
1 µg Kofaktor (fakultativ) z.B. pSG5-TIF2	1 µg Kofaktor (fakultativ) z.B. pSG5-TIF2

Tab. 8: Transfektions-Ansätze der beiden Reporter-Gen-Assays.

Die Tabelle zeigt, die bei der transienten Transfektion verwendeten DNA-Mengen. Die Angaben der Tabelle beziehen sich jeweils auf ein *Well*.

Die DNA-Mischung wurde mit dH₂O und 15 µl N-[1-2,3Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat (DOTAP) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl eingestellt und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 0,9 ml Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben, von denen vorher das Medium entfernt worden war. 4 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Stimulation der Zellen mit 1 µM 1,25(OH)₂D₃ oder 1 µM 1,25(OH)₂D₃-Analoge. Hierzu wurden 500 µl DMEM-Medium (supplementiert mit 2 mM L-Glutamin und jeweils 100 U/ml Penicilin und Streptomycin) mit 30 % gereinigtem FBS und Ligand (oder als Kontrolle Ethanol) versetzt und zu den Zellen gegeben. Im Anschluß an die Stimulation wurden die Zellen für weitere 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS/*Well* gewaschen. Im Anschluß wurden die Zellen mit 200 µl *Reporter-gene-lysis-buffer* 15 min bei RT lysiert. Das Zelllysate wurde 5 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde wie folgt auf 96-*Well*-Platten verteilt:

Reporter-Gen-Assay in Cos-7 oder MCF-7 Zellen		Mammalian-One-Hybrid-Assay in HeLa Zellen	
Luciferase Messung	-Galactosidase Messung	Luciferase Messung	Bradford Proteinbestimmung
weiße 96- <i>Well</i> -Platte	weiße 96- <i>Well</i> -Platte	weiße 96- <i>Well</i> -Platte	transparente 96- <i>Well</i> -Platte
130 µl	50 µl	150 µl	5 µl

Tab. 9: Pippetierrschema der Reporter-Gen-Assays. Die Tabelle zeigt das Pippetierrschema der Reporter-Gen-Assays.

Für die Messung der Luciferase-Genaktivität wurden 100 µl Luciferase-Substrat zugegeben und die Aktivitätsmessung erfolgte in einem *Multilabelcounter* (Viktor oder Lucy2). Für die -Galactosidase Messung wurden 100 µl -Galactosidase-Substrat hinzugegeben und die Platte wurde eine Stunde bei RT auf dem Wiege-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl basischer Puffer zur Reaktion gegeben, wodurch eine Spaltung des gebildeten umgesetzten Substrates erfolgt. Bei dieser Spaltung kommt es zur Lichtemission, die ebenfalls im *Multilabelcounter* gemessen wurde. Für die Proteinbestimmung wurden zu den 5 µl Lysat 200 µl Bradford Reagenz (1:5 verdünnt) gegeben und die Platte wurde 5 min bei RT inkubiert, bevor sie photometrisch im *Multilabelcounter* bei 595 nm gemessen wurde.

Bei der Auswertung des Reporter-Gen-Assays wurde die Hintergrundstrahlung (*Reporter-gene-lysis-buffer*) von den Proben abgezogen und die Luciferase-Aktivität in Relation zur Galactosidase-Aktivität normalisiert. Für den *Mammalian-One-Hybrid-Assay* erfolgte die Normierung mittels der gemessenen Extinktionswerten der Proteinbestimmung.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der repressorischen Eigenschaften des VDR

3.1.1 Intrinsische repressorische Eigenschaften des VDR

Der Einfluß des VDR auf die Genaktivität von 1,25(OH)₂D₃-regulierten Genen in Abwesenheit eines Liganden ist für ein Verständnis der VDR-vermittelten Genrepression von Bedeutung. Untersuchungen der Genaktivitäten von 1,25(OH)₂D₃-regulierten Genen werden am besten *in vivo* durchgeführt. Hierzu bietet sich der Reporter-Gen-Assay (2.2.2.2) an. Dabei werden Zellen mit einem Luciferase-Reporter-Gen transient transfiziert, das von einer oder mehreren Kopien eines VDRE vor einem *tk*-Promotor gesteuert wird. Durch die gleichzeitige Überexpression von VDR und RXR in den Zellen kann der Einfluß des VDR auf die Aktivität des Luciferase-Reporter-Genes untersucht werden.

In Cos-7 Zellen wurden ein Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt (siehe 2.1.7.6), welches durch eine Kopie eines komplexen DR3/DR6-Typ VDRE aus dem menschlichen Osteocalcin-Gen gesteuert wurde sowie steigenden Mengen der Expressionsplasmide für VDR und RXR, transient überexprimiert. Das komplexe DR3/DR6-Typ VDRE wurde deshalb gewählt, da es wegen seiner internen Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor AP-1 einen relativ hohen Basalwert (Hintergrund) vermittelt. Die normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurden als Stimulationsfaktor, bezogen auf die Kontrolle (laut Definition: Ethanol = 1) dargestellt (**Abb. 14**).

In Abwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ reprimierten steigende Mengen an VDR die Aktivität des Reporter-Genes [Repression auf einen Stimulationsfaktor von 0,29 bezogen auf den Ethanol-Kontrollwert (= 1), bei einer Transfektion der Zellen mit 3,0 µg VDR-Expressionsvektor], während der Partnerrezeptor RXR keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität des Reporter-Genes zeigte (**Abb. 14**). Die durch den VDR-vermittelte Repression des Reporter-Genes entspricht einem Repressionsfaktor von ca. 3,5.

Interessanterweise wurde die VDR-vermittelte Repression des Reporter-Genes in Anwesenheit des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA (schwarze Säulen) komplett verhindert. Es konnte keine Repression der Aktivität des Reporter-Genes beobachtet werden.

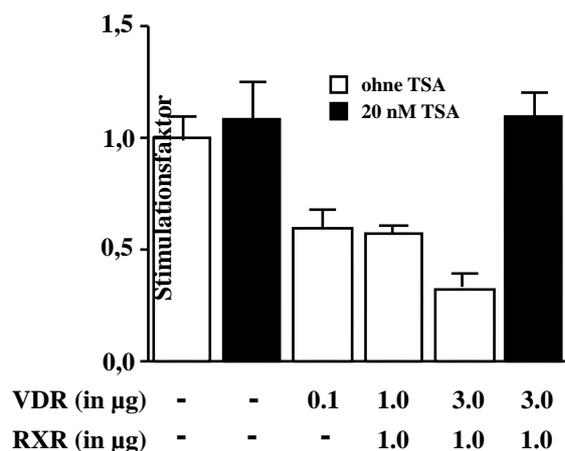


Abb. 14: VDR-vermittelte Repression. In Cos-7 Zellen wurden mittels transients Transfektion ein Luciferase-Reportergen, welches durch eine Kopie eines komplexen VDRE (VDRE des menschlichen Osteocalcingen-Promotors) gesteuert wurde und angegebene Mengen an VDR und RXR Expressionsplasmiden überexprimiert. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit Ethanol [0,1 % (v/v)] oder dem HDAC-Inhibitor TSA (20 nM) inkubiert. Dargestellt wurden die auf die β -Galactosidase-Aktivität normalisierten Luciferase-Aktivitäten, bezogen auf die Aktivität der Kontrolle. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

3.1.2 Interaktion des VDR mit Korepressoren *in vitro*

Die im Reporter-Gen-Assay gezeigte, repressorische Eigenschaft des VDR könnte über Interaktion des VDR mit Korepressoren vermittelt werden. Darauf deutet besonders die Sensitivität gegenüber dem Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA hin.

Um eine Protein-Protein-Interaktion des VDR mit Korepressoren zu untersuchen, wurde der GST-Pulldown Assay gewählt. Dabei wurde bakteriell überexprimierter Korepressor mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem VDR, jeweils mit und ohne Ligand, inkubiert. Die präzipitierten Proteinmengen wurden quantifiziert und in **Abb. 15** als Prozent bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge (*Input*) dargestellt.

Der GST-Pulldown Assay (2.2.1.9) zeigte, daß der VDR Ligand-abhängig mit den beiden untersuchten Korepressoren Alien und NCoR (**Abb. 15**) interagieren kann. In Abwesenheit von $1 \mu\text{M}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnten mit GST-Alien 3 % des eingesetzten [35 S]-markierten VDR-*Input* präzipitiert werden und mit GST-NCoR₂₂₁₈₋₂₄₅₃ wurden sogar bis zu 11 % an VDR-*Input* präzipitiert. In Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte dagegen mit GST-Alien nur 1 % VDR-*Input* und mit GST-NCoR ca. 3 % VDR-*Input* präzipitiert werden. Damit ist die Interaktion des VDR mit Korepressoren in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ etwa 60-70 % geringer als bei der Ethanol-Kontrolle, d.h. durch die Anwesenheit des Liganden kommt es zur Dissoziation der VDR-Korepressor-Komplexe.

Eine vollständige Dissoziation der VDR-Korepressor-Komplexe konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Die gezeigte *in vitro* Interaktion des VDR mit den untersuchten Korepressoren konnte auch *in vivo* im *Yeast-Two-Hybrid-Assay*, in Zusammenarbeit mit der Gruppe von PD Dr. A. Baniahmad (Uni Gießen), bestätigt werden [136].

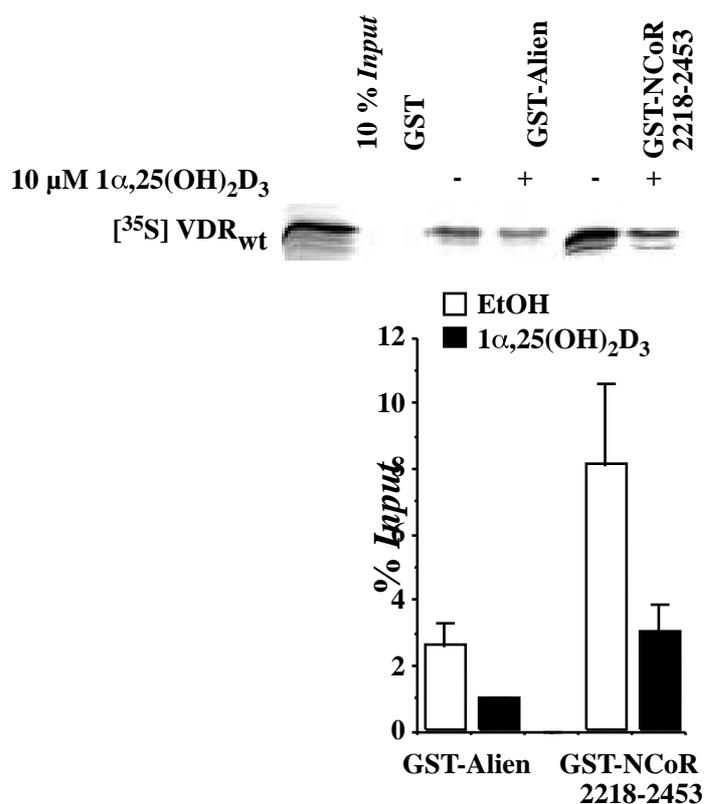


Abb. 15: VDR-Korepressor Interaktion *in vitro*. GST-Pulldown Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem VDR und bakteriell überexprimierten GST-Alien oder GST-NCoR $_{2218-2453}$ durchgeführt. *In vitro* translatierter, [35 S]-markierter VDR wurde für 20 min bei RT mit Ethanol oder 10 μ M 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ vorinkubiert. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem VDR (Ethanol- oder 10 μ M 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -behandelte Proben) im Verhältnis zum eingesetzten VDR (*Input*) wurde im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

3.1.3 Charakterisierung der Ligand-abhängigen VDR-Korepressor-Dissoziation

Eine Ligand-abhängige VDR-Korepressor-Dissoziation ist eine wesentliche Voraussetzung für die Ligand-induzierte Genaktivierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Genen.

Diese Ligand-abhängige VDR-Korepressor-Dissoziation wurde im *GST-Pulldown Assay* (2.2.1.9) mit bakteriell exprimierten GST-Alien oder GST-NCoR und dem VDR in Anwesenheit steigender $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen untersucht (**Abb. 16A/B**). Um den inhibitorischen Effekt der Ligand-Bindung des VDR auf die VDR-Korepressor-Interaktion zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Hierzu wurden die präzipitierten Proteinmengen quantifiziert und als prozentualer Anteil zum *Input* gegen die jeweilige Ligand-Konzentration aufgetragen. Dadurch konnten die halbmaximalen Inhibitionswerte (IC_{50} -Werte) aus den Dosis-Wirkungskurven bestimmt werden. Bei näherer Betrachtung der Dosis-abhängigen Dissoziation der VDR-Korepressor-Komplexe ist die VDR-NCoR-Interaktion mit einem IC_{50} -Wert des Komplexes von 330 nM geringfügig Ligand-sensitiver als die VDR-Alien-Interaktion, die einen IC_{50} -Wert von 400 nM aufwies. Die Unterschiede in den IC_{50} -Werten sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Die funktionellen Konsequenzen einer VDR-Korepressor-Interaktion wurden *in vivo* im Reporteragen-Assay (2.2.2.2) in Cos-7 Zellen untersucht, in denen mittels transienter Transfektion die Rezeptoren VDR und RXR sowie die Korepressoren Alien oder NCoR zusammen mit einem Luciferase-Reporteragen-Konstrukt, das durch vier Kopien eines DR3-Typ VDRE (ANF-Promotor der Ratte, siehe 2.1.7.6) gesteuert wurde, überexprimiert wurden (**Abb. 16C/D**). Dieses Reporteragen-Konstrukt wird im weiteren als $(\text{DR3})_4\text{-LUC}$ bezeichnet (siehe auch 2.1.7.5).

Die auf die β -Galactosidase-Aktivität normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurden als Stimulationsfaktoren bezogen auf die Ethanol-Kontrolle dargestellt und ebenfalls gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. Die Kurven zeigen das typische Profil einer Dosis-Wirkungsabhängigkeit. Aus den Kontroll-Kurven, aus Untersuchungen in denen die Zellen nicht mit Korepressor überexprimiert waren, konnte eine halbmaximale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration (EC_{50} -Wert) von 4 nM bestimmt werden. Der Stimulationsfaktor bei sättigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ betrug 10, d.h. es konnte eine 10-fach höhere Genaktivität des Reporteragens beobachtet werden als bei der Ethanol-Kontrolle (= 1). Die Überexpression von Alien, aber auch die Überexpression von NCoR, bewirkte eine deutliche Reduktion der Reporteragen-Aktivität über die gesamte Konzentrationsspanne von 0,01-100 nM, beeinflussten aber nicht die EC_{50} -Werte von 4

nM. Bei sättigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde durch die Überexpression von Alien nur eine 6-fache Aktivität des Reportergens erzielt, während die Überexpression von NCoR eine geringfügig höhere Aktivität (6,8-fache Aktivität) erlaubte.

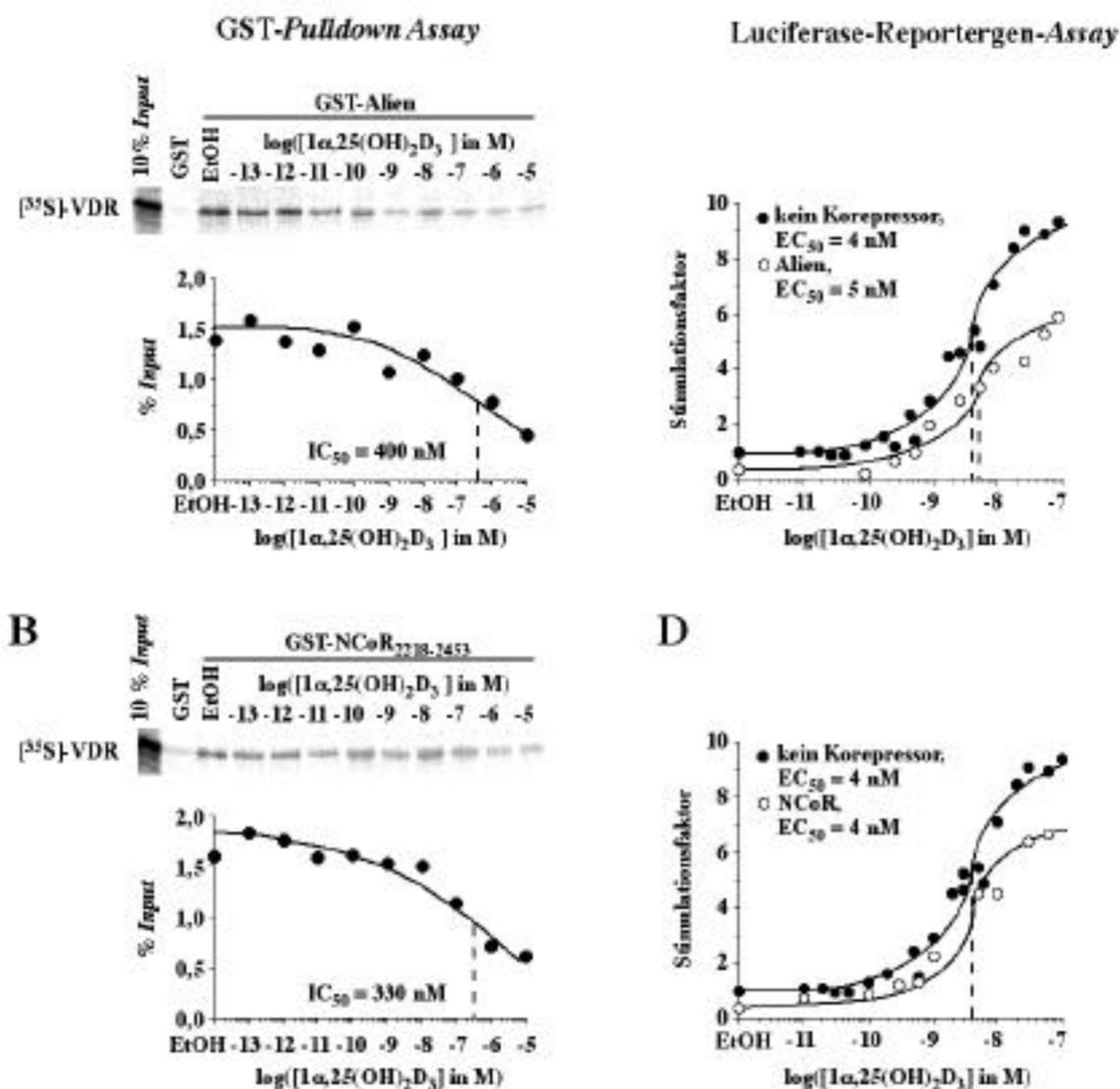


Abb. 16: Ligand-induzierte VDR-Korepressor Dissoziation *in vitro* und *in vivo*. GST-Pull-down Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem VDR und bakteriell überexprimiertem GST-Alien (A) oder GST-NCoR₂₂₁₈₋₂₄₅₃ (B) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durchgeführt. Repräsentative Gele sind gezeigt. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem VDR im Verhältnis zum Input wurde im *Bioimager* quantifiziert und die IC_{50} -Werte bestimmte. Transiente Transfektionen (C/D) wurden mit einem durch vier Kopien eines DR3-Typ VDREs (s. 2.1.7.5) gesteuerten Luciferase-Reporter-Konstrukt [(DR3)₄-LUC] sowie den Expressionsvektoren des VDR, RXR (in allen Ansätzen) und Alien (C) oder NCoR (D), in Cos-7 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [oder 0,1 % (v/v) Ethanol] inkubiert. Auf β -Galactosidase-Aktivität normalisierte Luciferase-Reporter-Aktivität wurde in Relation zur Ethanol-Kontrolle als Stimulationsfaktor dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikat-Messungen. Die Standardabweichungen lagen generell unter 10 %.

3.1.4 Die VDR-Korepressor-Interaktion ist AF2-unabhängig

Die Bindung des Liganden an die AF2-Domäne des VDR bewirkt eine Ligand-abhängigen Konformationsänderung wie deutlich aus den Kristallstrukturdaten des RAR hervorgeht (**Abb. 5**). Diese Konformationsänderung könnte eine Dissoziation des Korepressors bewirken. Da die Dissoziation des Korepressors ebenfalls Ligand-abhängig ist, besteht die Möglichkeit, daß die AF2-Domäne des VDR an eine Ligand-induzierten VDR-Korepressor-Dissoziation beteiligt ist.

Die Bedeutung der AF2-Domäne des VDR für die VDR-Korepressor-Interaktion wurde in *GST-Pulldown Assays* (2.2.1.9) mittels einer VDR-Mutante untersucht, der die AF2-Domäne fehlt (VDR_{413Stop}). Die präzipitierten Proteinmengen wurden quantifiziert und in **Abb. 17** in Prozent zum *Input* dargestellt.

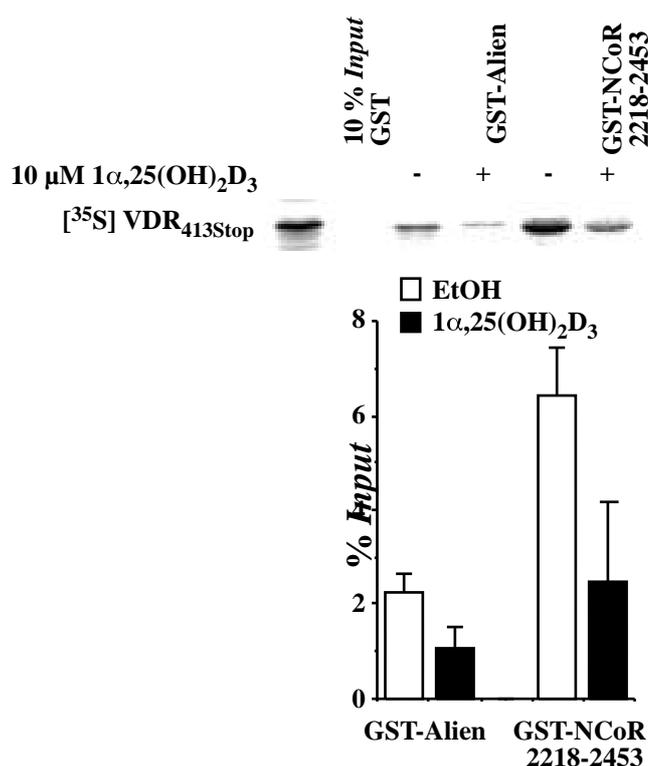


Abb. 17: Bedeutung der AF2-Domäne für die VDR-Korepressor-Interaktion. GST-*Pulldown Assays* wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR_{413Stop} und bakteriell überexprimiertem GST-Alien oder GST-NCOR₂₂₁₈₋₂₄₅₃ durchgeführt. [³⁵S]-markierter VDR_{413Stop} wurde für 20 min mit Ethanol oder 1,25(OH)₂D₃ (10 μM) vorinkubiert. Ein repräsentatives Gele ist abgebildet. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem VDR im Verhältnis zum *Input* wurden im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

Der GST-*Pulldown Assay* ergab, daß weder die Interaktion zwischen VDR_{413Stop} und den Korepressoren Alien und NCoR noch die Ligand-induzierte Dissoziation des VDR_{413Stop}-Korepressor-Komplexes durch das Fehlen der AF2-Domäne beeinflußt wurde.

Wie bei dem Wildtyp VDR (3.1.2) konnten in Abwesenheit von 1 μ M 1 α ,25(OH)₂D₃ mit GST-Alien ca. 2,5 % an [³⁵S]-markiertem VDR_{413Stop}-*Input* präzipitiert werden. Die Präzipitation des VDR_{wt} betrug 3 % (siehe **Abb. 15**). Bei den Untersuchungen mit GST-NCoR₂₂₁₈₋₂₄₅₃ konnten 7 % an [³⁵S]-markiertem VDR_{413Stop}-*Input* präzipitiert werden. Im Vergleich hierzu konnten 11 % des VDR_{wt}-*Input* präzipitiert werden (**Abb. 15**). Der Unterschied zwischen VDR_{wt} und VDR_{413Stop} ist jedoch nicht statistisch signifikant. Bei sättigenden Konzentrationen an 1 μ M 1 α ,25(OH)₂D₃ konnte mit GST-Alien noch 1 % und mit GST-NCoR 2 % an VDR_{413Stop}-*Input* präzipitiert werden. Diese Ergebnisse unterschieden sich ebenfalls nicht von den Untersuchungen mit dem VDR_{wt} (vgl. **Abb. 15**).

Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, daß die VDR-Korepressor-Interaktion und auch die Ligand-induzierte Dissoziation des Komplexes von der AF2-Domäne des VDR unabhängig sind. Es wurden auch Untersuchungen an anderen Punktmutanten des VDR durchgeführt. Diese Punktmutanten befanden sich alle in H1. Es konnte jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp VDR aufgezeigt werden. Die untersuchten Aminosäuren sind an der VDR-Korepressor-Interaktion nicht beteiligt gewesen.

3.2. Untersuchung der Ligand- und Koaktivator-induzierten Genaktivierung durch den VDR

3.2.1 1 α ,25(OH)₂D₃-induzierte Reporter-gen-Aktivität in HeLa-Zellen

Die Signalübertragung durch nukleäre Hormone (**Abb. 1**) erfolgt über eine Ligand-induzierte Aktivierung des Rezeptors. Potente Analoge aktivieren den Rezeptor schon bei geringen Ligand-Konzentrationen.

Die VDR-vermittelte, Ligand-abhängige Aktivität des Luciferase-Reportergens wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe des *Mammalian-One-Hybrid-Assay* (2.2.2.2) untersucht. Die Zellen wurde transient mit ein Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus der DBD des GAL4-Hefe-Transkriptionsfaktors und der LBD des VDR transfiziert. Dieses Konstrukt

wird im weiteren als Gal4_{DBD}-VDR_{LBD} bezeichnet (2.1.7.4). Gleichzeitig wurde in den Zellen auch ein Reporter-gen-Konstrukt, in welchem das Luciferasegen durch drei Kopien der GAL4-DNA-Bindestelle (2.1.7.4) gesteuert wurde, überexprimiert. Dieses Konstrukt wird im weiteren als (Gal4)₃-LUC bezeichnet.

Die auf die Proteinmenge normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurden als Stimulationsfaktoren gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. In diesem Referenz-Experiment induzierte 1,25(OH)₂D₃, bei sättigenden Konzentrationen (10 µM) eine maximal 22-fache Stimulation des Luciferase-Reportergens im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol. Der aus der Dosis-Wirkungskurve bestimmte EC₅₀-Wert betrug 0,9 nM (Abb. 18).

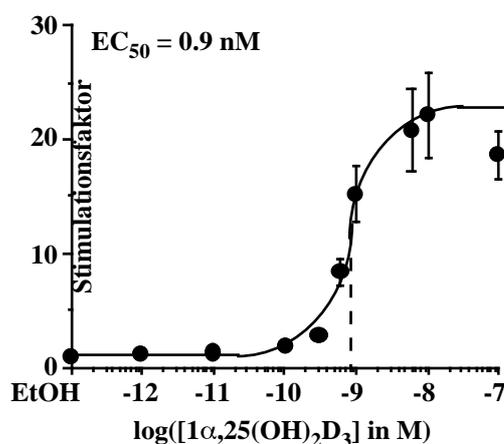


Abb. 18: Funktionelle Ligand-abhängige Genaktivierung im *Mammalian-One-Hybrid-System*. Luciferase-Reporter-gen-Aktivität wurde in HeLa-Zellextrakten bestimmt, die mittels transients Transfektion mit dem (Gal4)₃-LUC und dem GAL4_{DBD}-VDR_{LBD} Fusionsprotein (2.1.7.4) transfiziert worden waren. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen 1,25(OH)₂D₃ inkubiert. Die Stimulation der auf die Proteinmengen normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurde in Bezug auf die Ethanol-Kontrolle berechnet. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikat-Messungen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Der EC₅₀-Wert der Ligand-induzierten Reporter-gen-Aktivität wurde aus der Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

3.2.2 Charakterisierung der DNA-unabhängigen VDR-Koaktivator-Interaktion

Für eine Genaktivierung durch den VDR muß dieser mit andern Proteinen wie Koaktivatoren interagieren, die den Kontakt mit den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen.

Eine DNA-unabhängige Protein-Protein-Interaktion des VDR mit dem Koaktivator TIF2 wurde im *GST-Pulldown Assay* (2.2.1.9) mit bakteriell exprimiertem GST-TIF₆₄₆₋₉₂₆-Fusionsprotein und *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR untersucht. Das

verwendete Fusionsprotein des Koaktivators TIF2 enthält die auf der Seite der Koaktivatoren wichtigen ID-Bindemotive (LXXLL-Motive, Kap. 1.3) für die Interaktion mit nukleären Rezeptoren.

Der *GST-Pulldown Assay* zeigte, daß der VDR Ligand-abhängig mit TIF₆₄₆₋₉₂₆ interagieren kann. In Anwesenheit sättigender Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 μM) konnten 18 % VDR-*Input* präzipitiert werden (**Abb. 19**), während bei der Ethanol-Kontrolle nur 2 % an VDR-*Input* präzipitiert wurden. Dies entspricht einer 9-fachen Ligand-induzierten VDR-Koaktivator-Interaktion.

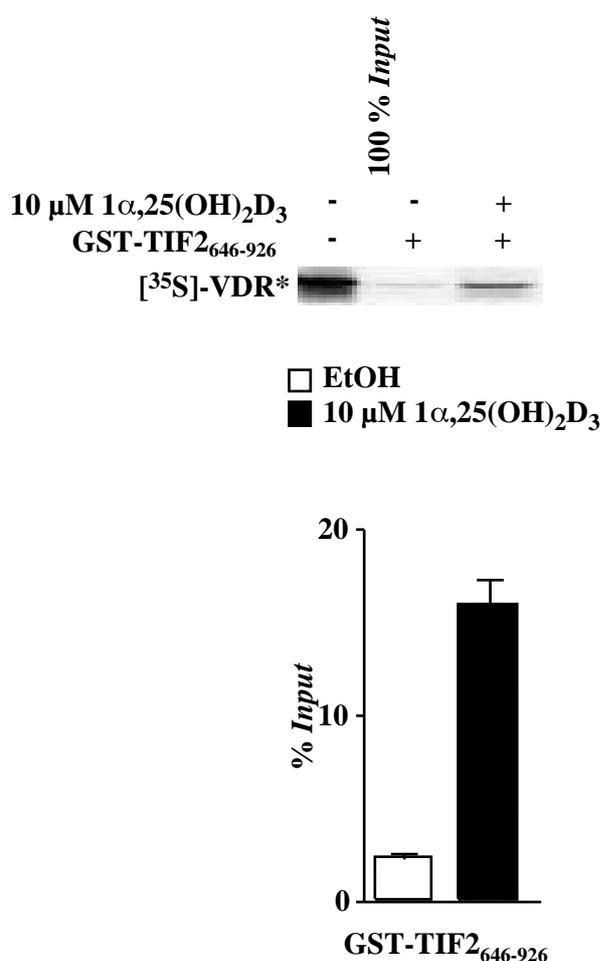


Abb. 19: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelt eine VDR-Koaktivator-Interaktion. *GST-Pulldown Assays* wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR und bakteriell exprimiertem GST-TIF₆₄₆₋₉₂₆-Fusionsprotein durchgeführt. Der VDR wurde bei sättigenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen (10 μM) für 20 min bei RT vorinkubiert. Nach der Präzipitation und anschließenden Waschungen wurden die Proben mittels Gelelektrophorese durch 10 % denaturierende SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem VDR wurde im *Bioimager* im Verhältnis zum *Input* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen und die Balken geben die Standardabweichung an.

3.2.3 Interaktion des VDR-RXR-VDRE-Komplexes mit Koaktivatoren

der SRC-1-Familie

Drei Koaktivatoren der SRC-Familie (SRC-1, TIF2 und RAC3) sind bislang bekannt. In Ligand- und DNA-abhängigen Untersuchungen (2.2.1.3) sollten diese Proteine bezüglich ihrer Fähigkeit, mit dem VDR zu interagieren verglichen, werden. Dazu wurden *in vitro* translatierte VDR-RXR-Heterodimere, die an ein DR3-Typ VDRE gebunden waren, in

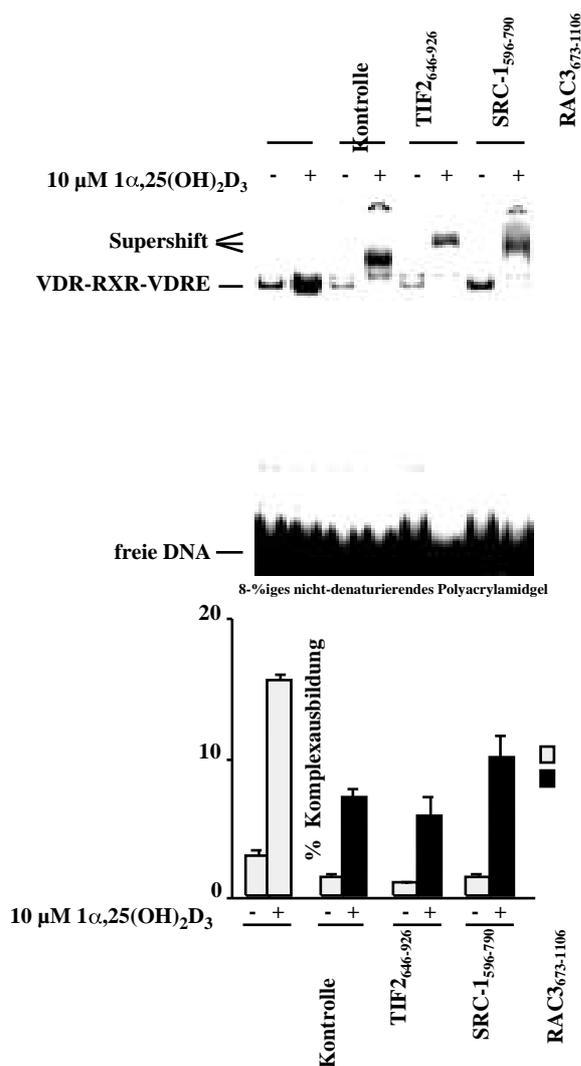


Abb. 20: Ligand-induzierter *Supershift* von DNA-gebundenen VDR-RXR-Heterodimeren. *Supershift*-Assays wurden mit *in vitro* translatierten VDR-RXR-Heterodimeren durchgeführt, die mit bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen der Koaktivatoren bei sättigenden Ligand-Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 μM) vorinkubiert und anschließend mit [^{32}P]-markiertem DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors weiter inkubiert wurden. Die Trennung der VDR-RXR-Heterodimere von der freien DNA erfolgte auf 8 %igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. Die Menge an VDR/RXR/VDRE- (graue Balken) oder VDR/RXR/VDRE/Koaktivator-Komplexen (*Supershift*; schwarze Balken) im Verhältnis zur freien DNA wurde im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen und die Balken geben die Standardabweichung an.

Supershift-Assays in Anwesenheit von 3,0 µg GST-Fusionsproteinen der drei Koaktivatoren der SRC-Familie (SRC-1₅₉₆₋₇₉₀, TIF2₆₄₆₋₉₂₆ oder RAC3₆₇₃₋₁₁₀₆) und sättigenden Ligand-Konzentrationen inkubiert. Diese Proteine enthielten die, für die Interaktion mit nukleären Rezeptoren wichtigen LXXLL-Bindemotive. Die Quantifizierung der relativen Intensitäten der VDR-RXR-VDRE-Koaktivator-Komplexe (*Supershift*-Banden) weist daraufhin, daß alle drei Kofaktoren gleich gut mit dem VDR-RXR-VDRE-Komplex interagieren können (**Abb. 20**). Alle drei Koaktivatoren waren in der Lage, zwischen 8 % und 11 % des *Supershift*-Komplexes zu stabilisieren. Signifikante Unterschiede konnten nicht aufgezeigt werden.

Hier konnte die Ligand-Abhängigkeit der VDR-Koaktivator-Interaktion klar gezeigt werden, da es in Abwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ zu keinem *Supershift* des VDR-RXR-VDRE-Komplexes durch den Koaktivator kam.

3.2.4 Einfluß der AF2-Domäne auf die VDR-SRC-1-Interaktion

Die AF2-Domäne in H12 des VDR ist sowohl für die Ligand-Bindung als auch für die Koaktivator-Interaktion von Bedeutung (Kap. 1.1). Dieser Einfluß der AF2-Domäne auf die Koaktivator-Interaktion des VDR sollte bestätigt werden.

Ligand-abhängige *Supershift-Assays* (2.2.1.3) wurden nur mit SRC-1 durchgeführt, da in 3.2.2 kein Unterschied zwischen den Koaktivatoren der SRC-Familie beobachtet wurde. Die VDR-RXR-Heterodimere enthielten entweder den VDR-Wildtyp (wt) oder VDR-Mutanten, denen die AF2-Domäne fehlte, oder die spezifische Punktmutationen enthielten. Die *Supershift-Assays* wurden mit VDR-RXR-Heterodimere die an ein DR3-Typ VDRE gebunden waren, in der Anwesenheit von GST-SRC-1₅₉₆₋₇₉₀-Fusionsprotein durchgeführt (**Abb. 21**). Für den VDR_{wt}-RXR-VDRE-Komplex konnte nach Interaktion mit dem GST-SRC-1₅₉₆₋₇₉₀-Fusionsprotein einen *Supershift* gezeigt werden, während weder die AF2-Deletionsmutante des VDR (VDR_{413Stop}) noch die untersuchten Punktmutanten der AF2-Domäne (VDR_{417A}, VDR_{420A} und VDR_{422A}) mit SRC-1₅₉₆₋₇₉₀ interagieren konnten. Bei sättigenden Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃ (10 µM) konnte kein *Supershift* des VDR_{Mutanten}-RXR-VDRE-Komplexes beobachtet werden.

Die Ligand-induzierte Stabilisierung des VDR-RXR-VDRE-Komplexes wurde durch die Mutationen in der AF2-Domäne nicht beeinflusst. Es erfolgt eine gleich starke heterodimere Komplexbildung der VDR_{Mutanten} verglichen mit dem VDR_{wt}. Diese betrug etwa 40 %.

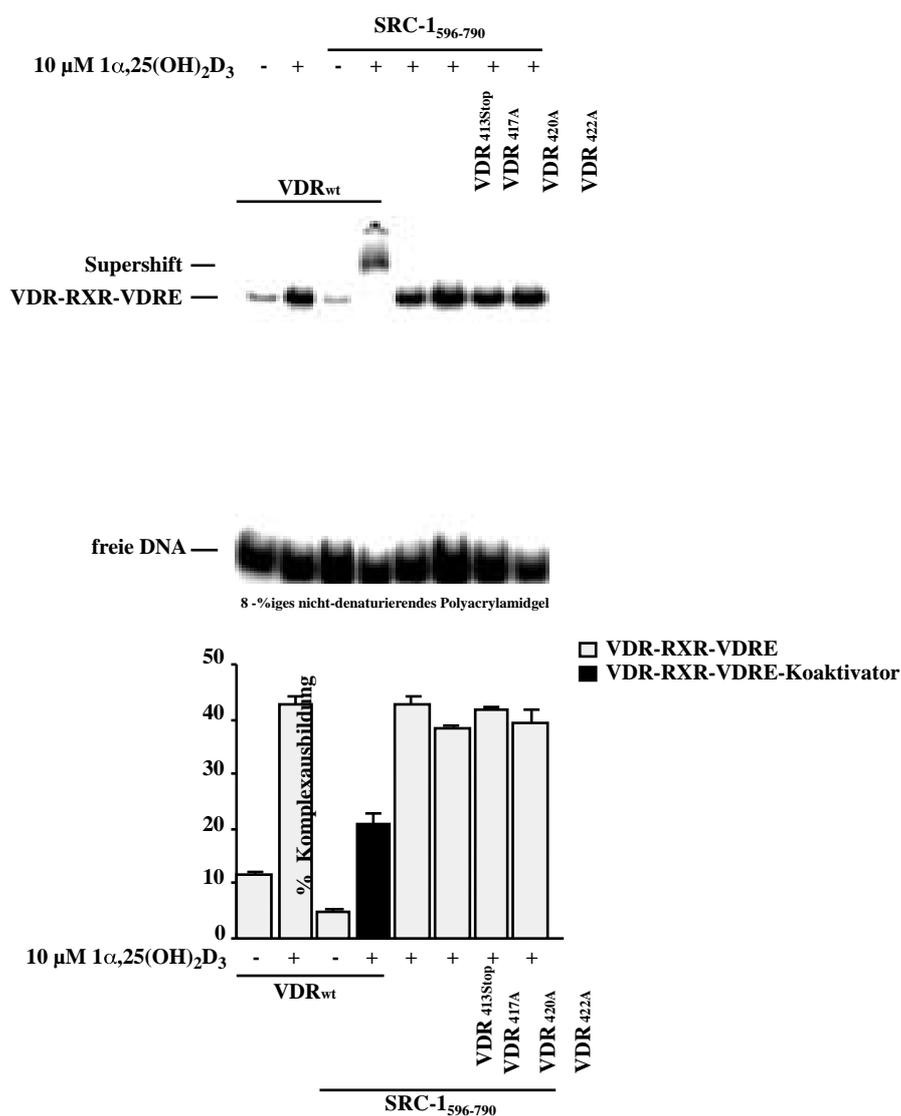


Abb. 21: Die AF2-Domäne des VDR ist für die Koaktivator-Interaktion notwendig. *Supershift-Assays* wurden mit *in vitro* translatierten VDR-RXR-Heterodimeren durchgeführt, die mit bakteriell exprimiertem GST-SRC-1₅₉₆₋₇₉₀-Fusionsprotein bei sättigenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen vorinkubiert und anschließend mit [³²P]-markiertem DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors inkubiert worden waren. Die Trennung der VDR-RXR-VDRE-(Kofaktor)-Komplexen von der freien DNA erfolgte durch 8 %ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgels. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Die Menge an VDR/RXR/VDRE- (graue Säulen) oder VDR/RXR/VDRE/Kofaktor-Komplexen (*Supershift*; schwarzer Säulen) im Verhältnis zur freien DNA wurde im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen und die Balken zeigen die Standardabweichung an.

Die gesamte AF2-Domäne der H12 sowie die Aminosäuren L417, E420 und F422 sind für die Interaktion des VDR mit Koaktivatoren essentiell.

3.3 Modulation der VDR-Kofaktor-Interaktion

3.3.1 TIF2 modulierte Reporter-gen-Aktivität in Cos-7 Zellen

Aus den vorhergegangenen Untersuchungen wird deutlich, daß alle Interaktionen des VDR mit Kofaktoren Ligand-abhängig sind. Somit besteht die Möglichkeit, durch die Verwendung verschiedener Liganden die Interaktion zu modulieren. Diese Hypothese soll im folgenden durch die Verwendung von Analogen getestet werden. Bei den verwendeten Analogen handelt es sich um 20-epi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (MC1288), 20-methyl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ZK161422) und Gemini, welches ein Analog mit zwei Seitenketten am Kohlenstoffatom 20 (C20) ist (Struktur siehe: 2.1.6.1).

Reporter-gen-Assays (2.2.2.2) wurden in Cos-7 Zellen, die dem $(\text{DR3})_4$ -LUC-Konstrukt (2.1.7.5/6) und mit Expressionsvektoren für VDR und RXR alleine oder zusätzlich mit TIF2 transient transfiziert worden waren, durchgeführt. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, MC1288, ZK161422 oder Gemini stimuliert. Die auf die β -Galactosidase-Aktivität normalisierten Luciferase-Reporter-gen-Aktivitäten wurden als Stimulationsfaktoren, bezogen auf die Ethanol-Kontrolle, dargestellt und gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen (**Abb. 22**).

Die EC_{50} -Werte aus den Kurven der Reporter-gen-Assays, bei denen kein TIF2 co-transfiziert worden war, zeigten, daß ZK161422 (2,0 nM, **C**) genauso sensitiv, in der VDR-Interaktion war wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (3,0 nM, **A**), während MC1288 (0,1 nM, **B**) und Gemini (0,8 nM, **D**) 4- und 30-fach sensitiver waren als der natürliche Ligand.

Die Überexpression von TIF2 in Cos-7 Zellen resultierte in einer Verschiebung der EC_{50} -Werte hin zu einer höheren Ligand-Sensitivität. Der Effekt einer Überexpression von TIF2 auf den EC_{50} -Werte war bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (von 3,0 nM auf 1,6 nM) und MC1288 (keine Veränderung des EC_{50} -Wertes) geringer, während bei den VDR-Agonisten ZK161422 (von 2,0 nM auf 0,06 nM) und besonders bei Gemini (von 0,8 auf 0,022 nM) eine bis zu 36-fache Zunahme der Sensitivität verzeichnet werden konnte. Neben der Zunahme der Ligand-Sensitivität konnte durch die TIF2-Überexpression auch eine stärkere Stimulation des Reporter-gens beobachtet werden. Die Kombination einer Überexpression von TIF2 mit einer Stimulation der Zellen mit Gemini resultierte in einer

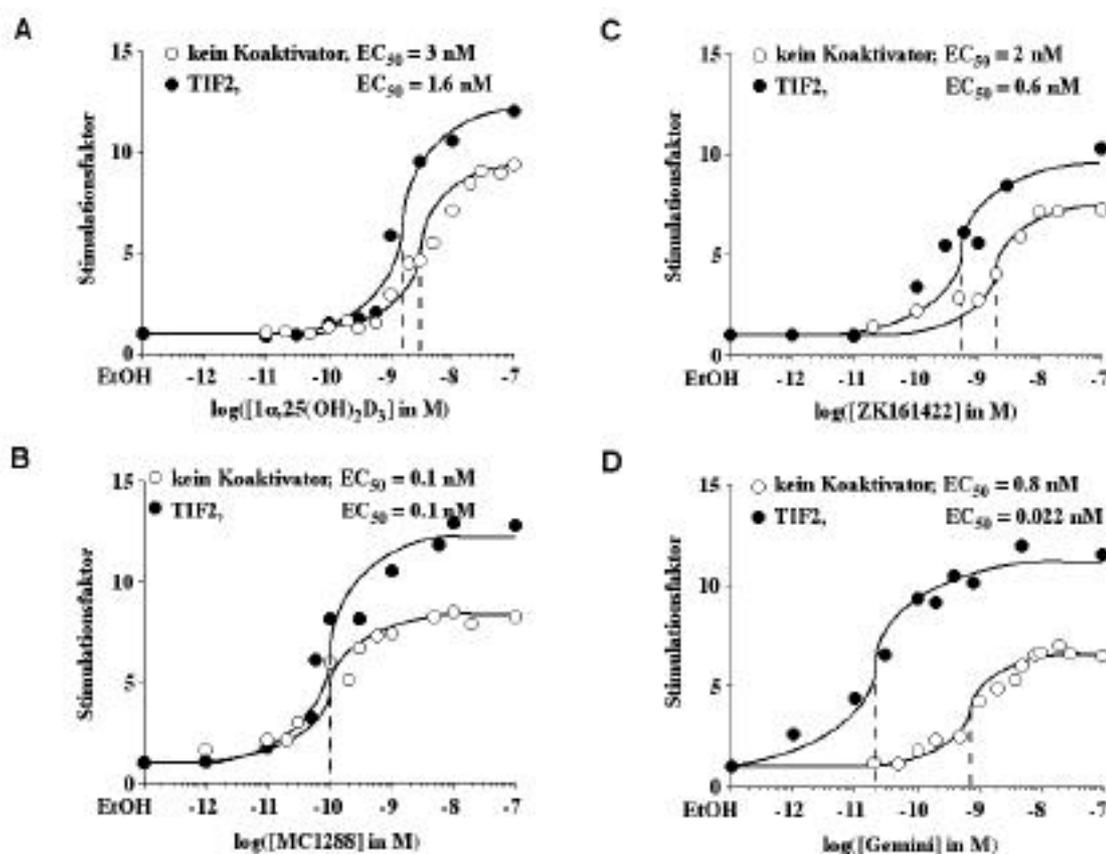


Abb. 22: TIF2 modulierte funktionelle Aktivität. Reportergen-Assays wurden mit Cos-7 Zellextrakten durchgeführt, in denen mittels transients Transfektion dem (DR3)₄-LUC-Konstrukt sowie den Expressionskonstrukten für VDR, RXR (in allen Proben, offene Kreise) und TIF2 (wie in der Abbildung angegeben, schwarze Kreise) überexprimiert worden waren. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion mit steigenden Konzentrationen an 1 α ,25(OH)₂D₃ (A), MC1288 (B), ZK161422 (C) und Gemini (D) für 16 Stunden stimuliert. Die Stimulation der auf die -Galactosidase-Aktivität normierten Luciferase-Aktivitäten wurden in Bezug zur Ethanol-Kontrolle berechnet und als Stimulationsfaktoren angegeben. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikaten, die Standardabweichung lag generell unter 10 %. Die EC₅₀-Werte für die Ligand-induzierte Reportergen-Aktivitäten wurden aus den Dosis-Wirkungskurven bestimmt.

zweifachen „Superstimulation“ des Luciferase-Reportergens. Demnach war die Genaktivität bei sättigenden Konzentrationen an Gemini in den Zellen, in denen TIF2 überexprimiert worden war, doppelt so hoch als in den Zellen, die kein TIF2 überexprimierten.

Die Untersuchungen wurden auch mit den beiden anderen Koaktivatoren der SRC-1 Familie durchgeführt (SRC-1 und RAC3). Diese beiden Koaktivatoren zeigten ähnliche Ergebnisse wie für TIF2.

3.3.2 Ligand-abhängige Modulation der VDR-TIF2 Protein-Protein-Interaktion *in vitro*

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Gemini hatten sich im Reportergen-Assay (3.3.1) am deutlichsten unterschieden. Die vorangegangenen Untersuchungen lassen die Vermutung zu, daß Gemini die VDR-Koaktivator-Interaktion besser stabilisiert als das natürliche Hormon. Gemini beeinflusste die Interaktion des VDR mit dem Koaktivator TIF2 im Vergleich zum natürlichen Liganden deutlich stärker. Daher wurden diese beiden Agonisten bezüglich ihrer Eigenschaft eine VDR-Koaktivator-Interaktion zu stabilisieren näher charakterisiert. Ligand-abhängige GST-Pulldown Assays (2.2.1.9) wurden mit bakteriell exprimiertem GST-VDR-Fusionsprotein und *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem TIF2₆₄₆₋₉₂₆ bei steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. Gemini durchgeführt (Abb. 23). Die bei der jeweiligen Ligand-Konzentration präzipitierten Proteinmengen wurden quantifiziert und als Prozent-Input gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermittelte eine Ligand- und Dosis-abhängige Präzipitation von bis zu 25 % des TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Input mit einem EC₅₀-Wert von 9,0 nM. Im Gegensatz zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war Gemini nur in der Lage, maximal 15 % des TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Input zu präzipitieren. Der entsprechende EC₅₀-Wert betrug 1000 nM. Demnach stabilisiert Gemini etwa 100 mal schwächer eine VDR-Koaktivator-Interaktion als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und ist selbst bei sättigenden Konzentrationen nur in der Lage, etwa 60 % der VDR-Koaktivator-Interaktion, verglichen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zu stabilisieren. Diese Daten stehen in einem klaren Widerspruch zu den Befunden im Reportergen-Assay.

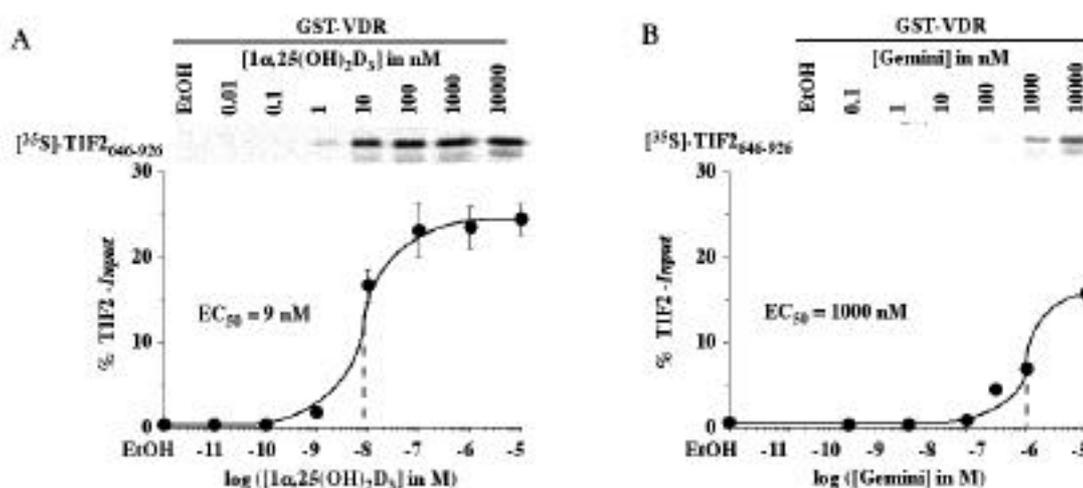


Abb. 23: Ligand-abhängige VDR-Koaktivator-Interaktion. GST-Pulldown Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem TIF2₆₄₆₋₉₂₆ und bakteriell exprimiertem GST-VDR-Fusionsprotein (A, B) durchgeführt. Der VDR wurde bei RT mit steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A) oder Gemini (B) inkubiert. Repräsentative Gele sind gezeigt. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem TIF2₆₄₆₋₉₂₆ im Verhältnis zum Input wurde im Bioimager quantifiziert. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert von Triplikat-Messungen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Die EC₅₀-Werte der Ligand-abhängigen VDR-TIF2-Interaktion wurden anhand der Dosis-Wirkungskurven ermittelt.

3.3.3 Einfluß der Liganden auf die VDR-RXR-VDRE-Koaktivator-Komplexbildung

Um die bezüglich Gemini aufgetretene Diskrepanz zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Daten näher zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob die gleichzeitige Bindung des VDR an DNA die Kofaktor-Interaktion beeinflussen kann. Deshalb wurde ein DNA-abhängiger *in vitro* Assay durchgeführt, der dem *in vivo* Assay näher kommt als der GST-Pull-down Assay.

Supershift-Assays (2.2.1.9d) wurden mit VDR-RXR-Heterodimeren, die an ein DR3-Typ VDRE gebunden waren, und bakteriell exprimiertem GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ bei steigenden Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃ bzw. Gemini (Abb. 24) durchgeführt. Die Ligand-

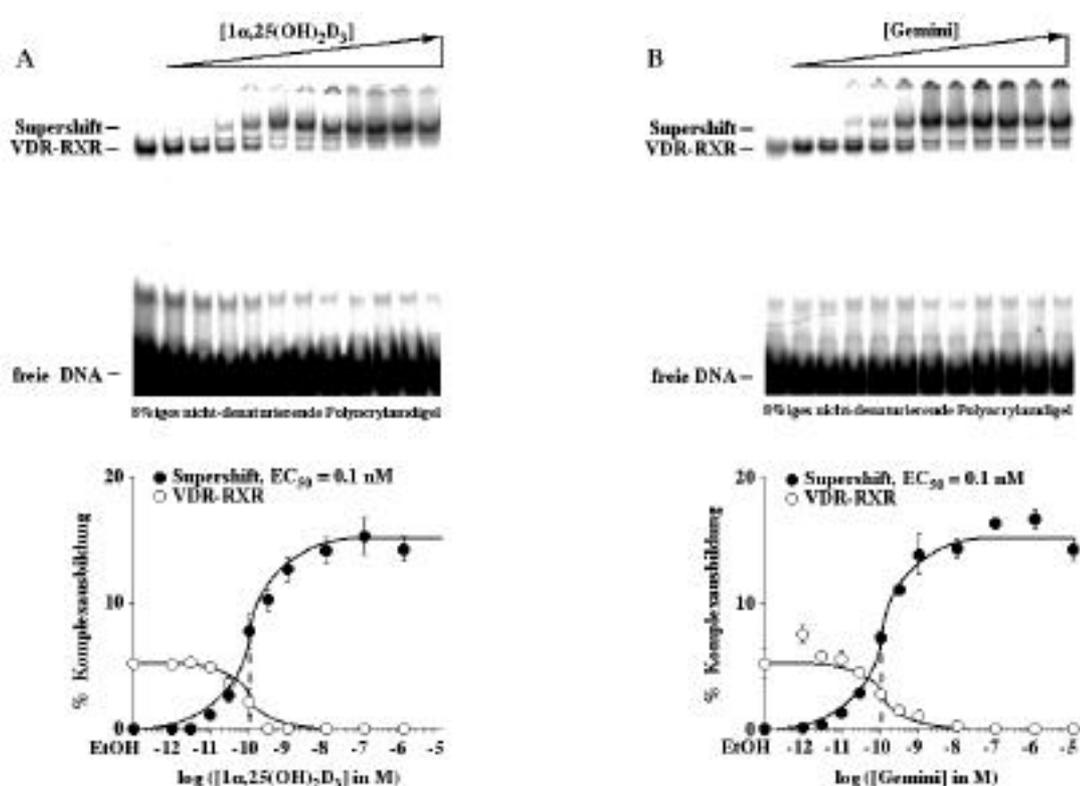


Abb. 24: Ligand-induzierter VDR-RXR-VDRE Supershift mit GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆. Gelshift-Assays wurden mit *in vitro* translatierten VDR-RXR-Heterodimeren, die mit bakteriell exprimiertem GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ sowie steigenden Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃ (A) und Gemini (B) vorinkubiert worden waren, durchgeführt. Die Proben wurden nach der Vorinkubation mit [³²P]-markiertem DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors weiter inkubiert. Die Trennung der VDR-RXR-VDRE-(Koaktivator)-Komplexe erfolgte durch 8 %ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgele von der freien DNA. Repräsentative Ergebnisse wurden gezeigt. Die Menge an VDR-RXR-VDRE- (offene Kreise) oder VDR-RXR-VDRE-Koaktivator-Komplexen (*Supershift*; schwarzer Kreise) im Verhältnis zur freien DNA wurde im *Bioimager* quantifiziert. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen und die Balken zeigen die Standardabweichung an.

induzierte Ausbildung des heterodimeren Komplexes auf dem VDRE und des VDR-RXR-VDRE-TIF2-Komplexes wurde quantifiziert und gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. Die anhand der Dosis-Wirkungskurven ermittelten EC_{50} -Wert für $1,25(OH)_2D_3$ und Gemini unterschieden sich jedoch nicht. Der EC_{50} -Wert betrug jeweils 0,1 nM.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß die beiden untersuchten VDR-Agonisten die gleiche Fähigkeit besitzen, eine VDR-Konformation zu induzieren, die eine Interaktion mit dem Koaktivator ermöglicht. Die Ligand-stabilisierten VDR-Konformationen wurden daher im weiteren genauer untersucht.

3.3.4 Funktionelle Konformationen des VDR

Die funktionellen Konformationen des VDR wurden im LPD-Assay (2.2.1.4) mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem VDR und der Endoprotease Trypsin untersucht (**Abb. 25**). In der Anwesenheit von sättigenden Konzentrationen an $1,25(OH)_2D_3$ (10 μM) wurden nach dem Verdau des VDR und der Auftrennung der Protein-Fragmente auf einem 15 %igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel zwei Protease-resistente Fragmente mit einer Molekularmasse von ungefähr 28 und 23 kD erhalten, die als Ligand-stabilisierte Konformationen ($c1_{LPD}$ und $c3_{LPD}$) des VDR interpretiert werden [137; 138]. In diesem Referenz-Experiment wurden 80 % der eingesetzten VDR-Menge in der Konformation $c1_{LPD}$ stabilisiert. Vergleicht man die prozentualen Mengen des Ligand-abhängig in der Konformation $c1_{LPD}$ stabilisierten VDR mit der Menge VDR die Ligand-unabhängig (Kontrolle) in $c1_{LPD}$ stabilisiert wurde, dann entspricht dies einer 10-fachen Ligand-induzierten Stabilisierung von $c1_{LPD}$. Im Gegensatz dazu wurden nur 10 % der Rezeptor-Moleküle in der Konformation $c3_{LPD}$ stabilisiert, die selbe Menge wurde auch nicht Ligand-abhängig stabilisiert.

Da die Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen möglicherweise eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen *in vivo* und *in vitro* Daten liefern können, wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die funktionellen Konformationen des VDR in Ligand- und Dosis-abhängigen LPD-Assays (2.2.1.4) untersucht.

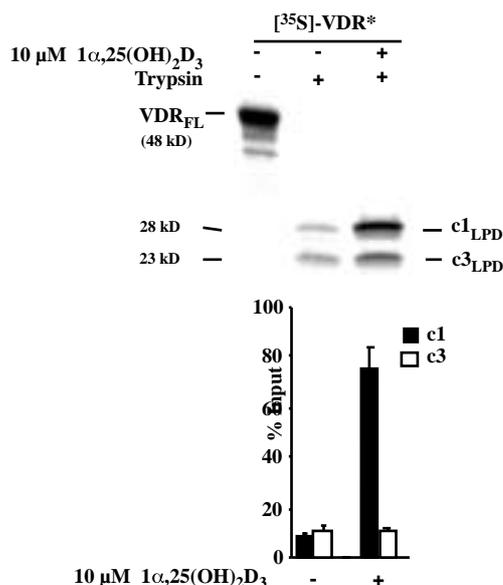


Abb. 25: Limitierter Proteaseverdau des VDR. LDP-Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem VDR, der mit sättigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($10\ \mu\text{M}$) vorinkubiert worden war, durchgeführt. Trypsin wurde dazu gegeben und die Proben wurden für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden durch 15 %ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Der Anteil an Ligand-stabilisiertem VDR in den Konformation $c1_{\text{LPD}}$ und $c3_{\text{LPD}}$ wurden in Relation zum VDR-Input im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

3.3.5 Modulationen der funktionellen Konformationen des VDR durch $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analoge, DNA, Koaktivatoren und Korepressoren

Um die verschiedenen Parameter untersuchen zu können, mußte der traditionelle LPD-Assay modifiziert werden. Die Modifikationen bestanden daran, daß der Reaktionsansatz neben dem VDR auch das Partnerprotein RXR, ein VDRE und Kofaktor-Proteine enthielt. Die LPD-Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem VDR und der Endoprotease Trypsin durchgeführt. In DNA-unabhängigen LPD-Assays (2.2.1.4) stabilisierte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei sättigenden Ligand-Konzentrationen ($10\ \mu\text{M}$) 80 % der VDR-Moleküle in der Konformationen $c1_{\text{LPD}}$ (**Abb. 26A**) und nur 20 % der VDR-Moleküle in Konformation $c3_{\text{LPD}}$, während im Referenz-Experiment nur 10 % der Moleküle in der Konformation $c3_{\text{LPD}}$ stabilisiert werden konnten. Dieser Unterschied kann durch verschiedene Translationsansätze erklärt werden. Der EC_{50} -Wert betrug für die Konformation $c1_{\text{LPD}}$ 8,0 nM. Im Gegensatz zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stabilisierte Gemini (**Abb.**

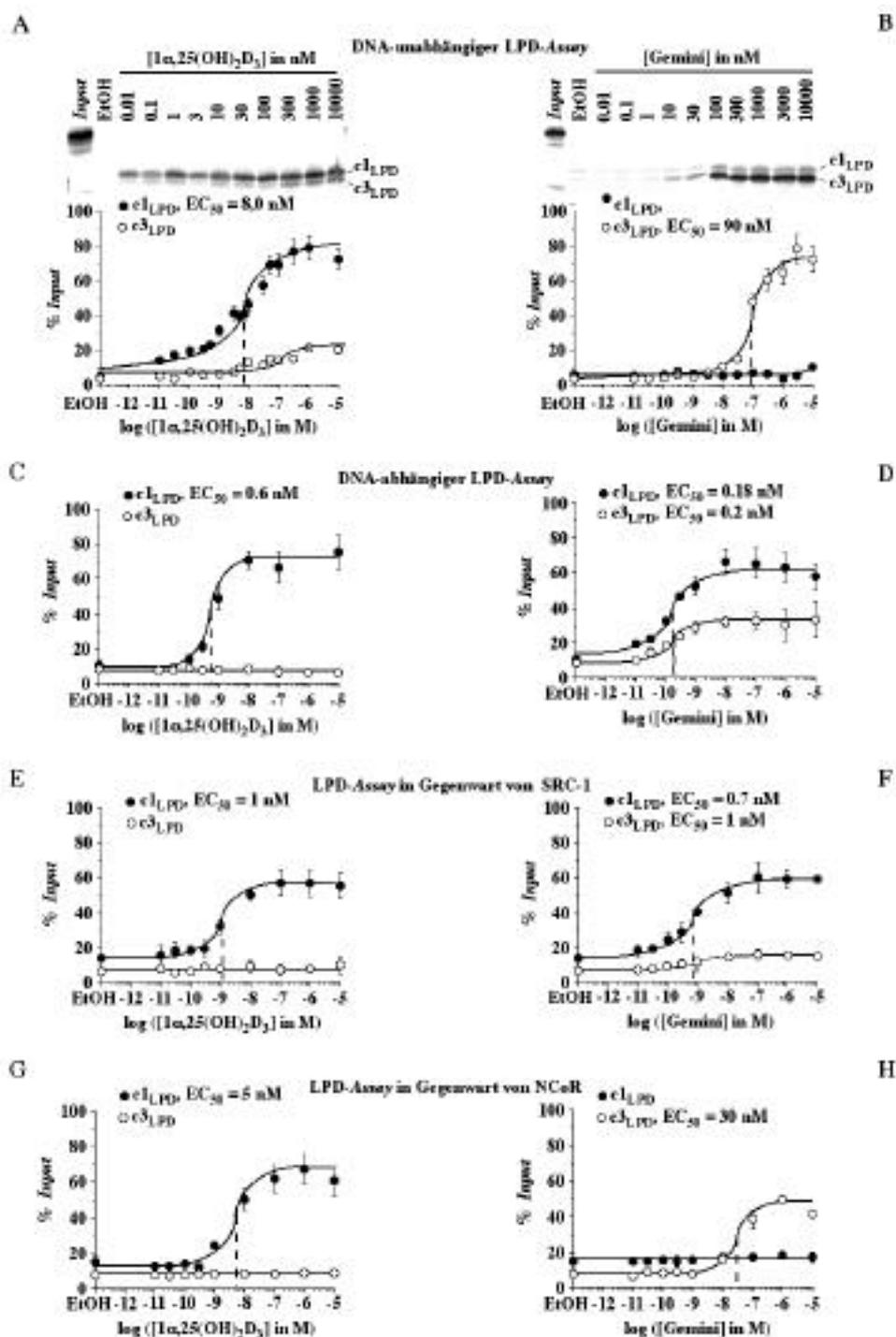


Abb. 26: Einfluß verschiedener Parameter auf die funktionellen Konformationen des VDR. LDP-Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem VDR (A-G), *in vitro* translatiertem, nicht radioaktiv-markiertem RXR (C-G) und 1 ng DR3-Typ VDRE (s. 2.1.7.6) (C-G) bei steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A, C, E und G) oder an Gemini (B, D, F, H) vorinkubiert; sowie mit circa $5 \mu\text{g}$ GST-SRC-1₅₉₆₋₇₉₀ oder GST-NCoR₁₆₇₉₋₂₄₅₃ (wie in der Abbildung angegeben) weiter inkubiert, durchgeführt. Trypsin wurde in einer End-Konzentration von $8,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ zugegeben und die Proben wurden für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden durch 15 %ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Repräsentative Gele sind gezeigt. Der Anteil an Ligand-stabilisiertem VDR in Konformation $c1_{\text{LPD}}$, (schwarze Punkte) und $c3_{\text{LPD}}$ (weiße Punkte) wurde in Relation zum VDR-Input im *Bioimager* quantifiziert. Die EC_{50} -Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungskurven bestimmt. Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

26B) bei sättigenden Konzentrationen etwa 80 % der VDR-Moleküle in Konformation $c3_{LPD}$ mit einem EC_{50} -Wert von 90 nM. Eine Ligand-abhängige Stabilisierung der Konformation $c1_{LPD}$ konnte nicht beobachtet werden.

Bei DNA-abhängigen LPD-Assays (2.2.1.4), bei denen neben *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markierten VDR auch *in vitro* translatierter, nicht radioaktiv-markierter RXR und nicht-markiertes, doppelsträngiges VDRE im Reaktionsansatz enthalten waren, zeigte sich, daß die heterodimere Komplexbildung keinen Einfluß auf das durch $1,25(OH)_2D_3$ stabilisierte Verhältnis der VDR-Konformationen hat. Wie auch beim DNA-unabhängigen LPD-Assay wurden beim DNA-abhängigen LPD-Assay bei sättigenden Konzentrationen (10 μ M) an $1,25(OH)_2D_3$ 80 % der VDR-Moleküle in Konformation $c1_{LPD}$ stabilisiert (**Abb. 26C**). Es konnte jedoch keine Ligand-abhängige Stabilisierung der Konformation $c3_{LPD}$ beobachtet werden. Deutliche Unterschiede zwischen dem DNA-unabhängigen und dem DNA-abhängigen LPD-Assay zeigten sich allerdings in der Ligand-Sensitivität. Der EC_{50} -Wert für $1,25(OH)_2D_3$ betrug beim DNA-abhängigen LPD-Assay nur 0,6 nM, d.h. er ist um über einen Faktor 10 niedriger als beim DNA-unabhängigen LPD-Assay (siehe auch Tabelle 3.3.5). Im DNA-abhängigen LPD-Assay mit Gemini zeigte sich, daß es zu einer DNA-abhängigen Verschiebung der stabilisierten Konformationen kam.

In Gegenwart des VDREs wurden rund 60 % der VDR-Moleküle in Konformation $c1_{LPD}$ stabilisiert und nur noch rund 30 % der VDR-Moleküle in Konformation $c3_{LPD}$ (zum Vergleich siehe **Tab. 10**). Auch im Fall von Gemini ist die Ligand-Sensitivität durch die Komplex-Ausbildung beeinflusst (**Abb. 26D**). Der EC_{50} -Wert für die Konformation $c3_{LPD}$ betrug 0,2 nM (Zunahme der Sensitivität um das 450-fache) und für die Konformation $c1_{LPD}$ 0,18 nM.

Um die Bedeutung von Kofaktoren auf die Konformation zu untersuchen, wurde bei den weiteren Untersuchungen der LPD-Assay nicht nur in Anwesenheit von DNA, sondern auch in Anwesenheit von Koaktivatoren durchgeführt. Im Fall von $1,25(OH)_2D_3$ hatte die Anwesenheit des Koaktivators SRC-1 (**Abb. 26E**) keinen Einfluß auf die Menge an stabilisierten VDR-Molekülen, das Verhältnis der Konformationen $c1_{LPD}$ zu $c3_{LPD}$ oder die Ligand-Sensitivität. Bei Gemini hingegen bewirkt die Anwesenheit von SRC-1 eine weitere Verminderung der in $c3_{LPD}$ -stabilisierten VDR-Moleküle auf nur noch 15 % (**Abb. 26F**).

Die Anwesenheit des Korepressors NCoR bewirkt bei $1,25(OH)_2D_3$ eine Verringerung der Ligand-Sensitivität (EC_{50} -Wert von 5,0 nM für $c1_{LPD}$), hatte aber keinen Einfluß auf die stabilisierten VDR-Moleküle (**Abb. 26G**). Im Falle von Gemini (**Abb. 26H**) führt die Anwesenheit von NCoR dazu, daß keine VDR-Moleküle mehr in Konformation $c1_{LPD}$ stabilisiert wurden. Die Menge an VDR-Molekülen, die in Konformation $c3_{LPD}$ stabilisiert

wurden, stieg wieder auf 50 % an. Ebenfalls kam es zu einer drastischen Abnahme der Sensitivität. Der EC_{50} -Wert für $c3_{LPD}$ betrug nur noch 30 nM.

Tabelle:

LPD-Assay		$1\alpha,25(OH)_2D_3$		Gemini	
		VDR stabilisiert	EC_{50} -Wert	VDR stabilisiert	EC_{50} -Wert
DNA-unabhängig	$c1_{LPD}$	80 %	8,0 nM	0 %	-
	$c3_{LPD}$	20 %	-	80 %	90,0 nM
DNA-abhängig	$c1_{LPD}$	80 %	0,6 nM	70 %	0,18 nM
	$c3_{LPD}$	0 %	-	30 %	0,2 nM
DNA-abhängig + SRC-1	$c1_{LPD}$	60 %	1,0 nM	75 %	0,7 nM
	$c3_{LPD}$	0 %	-	15 %	1,0 nM
DNA-abhängig + NCoR	$c1_{LPD}$	70 %	5,0 nM	0 %	-
	$c3_{LPD}$	0 %	-	20 %	30,0 nM

Tab. 10: Zusammenstellung der Ergebnisse der verschiedenen Typen an LPD-Assays für $1\alpha,25(OH)_2D_3$ und Gemini. Angegeben sind die EC_{50} -Werte sowie die Mengen an stabilisierten VDR-Molekülen in den entsprechenden Konformationen.

3.3.6 Bedeutung der AF2-Domäne des VDR auf die Modulation der Konformationen durch Kofaktoren

Die funktionelle Bedeutung der AF2-Domäne konnte in den vorangegangenen Versuchen klar gezeigt werden. Sie ist für die Koaktivator-Interaktion des VDR essentiell. Um den Einfluß der Kofaktoren auf die funktionellen Konformation des VDR_{wt} näher zu charakterisieren, sollten im LPD-Assay (2.2.1.4) die AF2-Deletionsmutante $VDR_{413Stop}$ (siehe auch 3.1.4 und 3.2.4) verwendet werden. Da die VDR-Korepressor-Interaktion (3.1.4) unabhängig von der AF2-Domäne des VDR ist, während die VDR-Koaktivator-Interaktion (3.2.4) durch die AF2-Domäne des VDR vermittelt wird, sollte dieser Assay den modulativen Einfluß der Kofaktoren auf die funktionellen Konformationen des VDR genauer untersuchen.

DNA-abhängige LPD-Assays (2.2.1.4) wurden mit $VDR/VDR_{413Stop}$ -RXR-VDRE-Komplexen und der Endoprotease Trypsin durchgeführt. Ligand-abhängige Konformationsänderungen wurden mit sättigenden Konzentrationen an $1,25(OH)_2D_3$ und Gemini induziert und zusätzlich wurde die Wirkung von Kofaktoren untersucht (Abb. 27A/B).

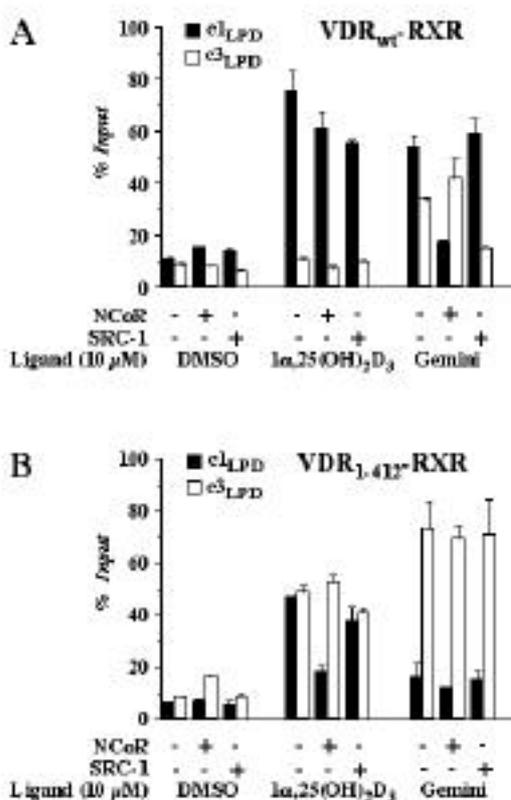


Abb. 27: Limitierter Proteaseverdau des VDR_{wt} und VDR_{Mutanten}. LPD-Assays wurden durchgeführt mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR_{wt} (A) oder VDR_{413Stop} (B), der mit sättigenden Konzentrationen (10 μM) an 1,25(OH)₂D₃ oder an Gemini und 1 ng DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors vorinkubiert sowie mit circa 5 μg GST-SRC-1₅₉₆₋₇₉₀ oder GST-NCOR₁₆₇₉₋₂₄₅₃ inkubiert waren. Trypsin wurde in einer End-Konzentration von 8,3 ng/μl dazugegeben und die Proben wurden für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden durch 15 %ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Der Anteil an Ligand-stabilisiertem VDR in Konformationen c1_{LPD}, (schwarze Säulen) und c3_{LPD} (weiße Säulen) wurde in Relation zum VDR-Input im Bioimager quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

Die Versuchsreihe mit VDR_{wt} bestätigt, daß durch 1,25(OH)₂D₃ fast alle VDR-Moleküle in der Konformation c1_{LPD} (**Abb. 27A**) stabilisiert werden und dies minimal durch die Anwesenheit von Koaktivatoren oder Korepressoren beeinflusst wird. Durch Gemini werden die VDR-Moleküle, mit Ausnahme in Gegenwart von NCoR, ebenfalls in der Konformation c1_{LPD} stabilisiert. Dadurch werden die Untersuchung mit VDR_{wt} überwiegend durch die Konformation c1_{LPD} charakterisiert.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ist das Muster, welches man im DNA-abhängigen LPD-Assays mit VDR_{413Stop} erhält, von Konformation c3_{LPD} geprägt (**Abb. 27B**). Nur in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ und SRC-1 konnten ungefähr gleiche Mengen an c1_{LPD} und c3_{LPD} stabilisiert werden (Stabilisierung beider Komplexe von etwa 40 % des Input),

während unter allen anderen Bedingungen nur etwa 20 % der VDR-Moleküle in Konformation $c1_{LPD}$ und 40 - 80 % in Konformation $c3_{LPD}$ stabilisiert wurden.

3.3.7 Ligand-induzierte und Korepressor-modulierte Dissoziation des VDR-RXR-Heterodimers vom Korepressor

Die Anwesenheit von NCoR führt zu einer präferenziellen Stabilisierung von Konformation $c3_{LPD}$, vor allem bei den durch Gemini-induzierten Konformationen. Der Einfluß dieser Stabilisierung auf den VDR-Korepressor-Komplex bzw. auf die Ligand-abhängige VDR-Korepressor-Dissoziation sollte näher charakterisiert werden.

Die Dissoziation des Korepressors NCoR von DNA-gebundenen VDR-RXR-Heterodimeren durch $1,25(OH)_2D_3$ oder Gemini wurde im *Supershift-Assay* (2.2.1.3) untersucht (**Abb. 28**). Die VDR-RXR-VDRE-NCoR-Komplexe sowie die VDR-RXR-VDRE-Komplexe wurden im Verhältnis zur freien DNA quantifiziert. Die *Supershifts* mit Korepressoren sind nicht einfach zu interpretieren, weil die Menge des VDR-RXR-VDRE-NCoR-Komplexes zusätzlich durch die Ligand-abhängige Stabilisierung des VDR-RXR-Heterodimers an der DNA beeinflusst wird. Daher wurde eine Darstellung gewählt, bei der die Dosis-abhängige Veränderung des Verhältnisses von VDR-RXR-VDRE-NCoR-Komplexen zu VDR-RXR-VDRE-Komplexen dargestellt ist. Diese Darstellung erlaubt eine Aussage über die Ligand-induzierte Dissoziation des VDR-RXR-VDRE-NCoR-Komplexes. Beide Komplexe wurden quantifiziert und anschließend wurde das Verhältnis der Komplexe zueinander bestimmt. Dieses Verhältnis wurde gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. Aus den Dosis-Wirkungskurven können die IC_{50} -Werte bestimmt werden.

Durch die Zugabe des natürlichen Hormons wurde das Verhältnis des *Supershift*-Komplexes zum heterodimeren Komplex um einen Faktor von 3,4 reduziert (von 1,7 auf 0,5). Der IC_{50} -Wert betrug 0,065 nM (**Abb. 28A**). Für Gemini konnte nur ein Faktor von 1,9 für die Abnahme dieses Verhältnisses berechnet werden (von 1,5 auf 0,8). Der IC_{50} -Wert betrug 0,1 nM (**Abb. 28B**). Beide Analoge zeigten demnach ungefähr die gleiche Sensitivität für die Korepressor-Dissoziation, es gibt keine signifikanten Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten. Das natürliche Hormon induziert aber wesentlich effektiver die VDR-Korepressor-Dissoziation. In Anwesenheit sättigender Konzentrationen an Gemini sind im Vergleich zum natürlichen Hormon etwa noch doppelt so viele VDR-NCoR-Komplexe vorhanden, die nicht dissoziiert sind.

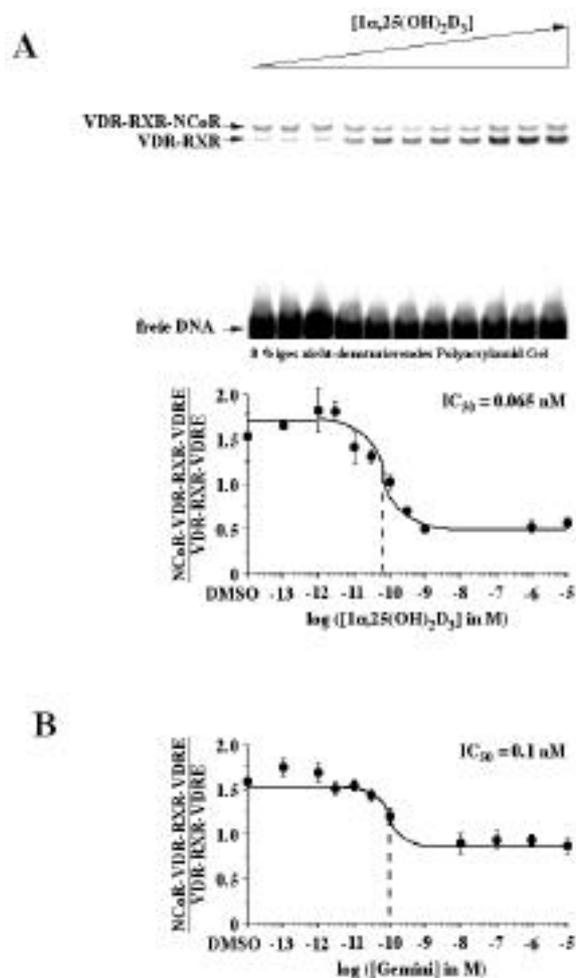


Abb. 28: Ligand-abhängige Modulation der Korepressor-Dissoziation. *Supershift-Assays* wurden mit *in vitro* translatierten VDR-RXR-Heterodimeren und bakteriell überexprimierten GST-NCoR₁₆₇₉₋₂₄₅₂ und dem [³²P]-markiertem DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors bei steigenden Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃ und Gemini durchgeführt. Protein-DNA-Komplexe wurden durch 8 %ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgele getrennt. Repräsentative Ergebnisse sind gezeigt. Die Menge an VDR-RXR-VDRE-NCoR-Komplex im Verhältnis zur entsprechenden VDR-RXR-VDRE-Komplex wurde im *Bioimager* quantifiziert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an. Die IC₅₀-Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungskurven bestimmt.

3.3.8 Bedeutung der Ligand-induzierten Verminderung der Korepressor-Dissoziation vom Heterodimer *in vivo*

Im Luciferase-Reportergen-*Assay* (2.2.2.2) in *Cos-7* Zellen wurde die Folge der durch Gemini deutlich schlechter induzierten Korepressor-Dissoziation auf eine VDR-abhängige Genaktivierung untersucht. *Cos-7* Zellen wurden transient mit dem (DR3)₄-LUC-Konstrukt, Expressionsvektoren für VDR, RXR und wie angegeben, mit NCoR transfiziert. Die Genaktivierung des Reportergens durch 100 nM 1,25(OH)₂D₃ oder

Gemini wurde bestimmt und als Stimulationsfaktor bezogen auf die Ethanol-Kontrolle dargestellt.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert in Abwesenheit von NCoR eine Stimulation des $(\text{DR3})_4$ -LUC-Reportergens um das 18-fache und Gemini um das 15-fache der Ethanol-Kontrolle (**Abb. 29**). Die beiden Analoge zeigen demnach bei sättigenden Ligand-Konzentrationen, ohne Korepressor Überexpression, keine signifikanten Unterschiede und bestätigen das unter 3.3.2 erzielte Ergebnis, können somit als gleich potent angesehen werden.

Interessanterweise reduzierte die Überexpression von NCoR die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermittelte Genaktivierung um den Faktor von 1,6 auf eine immer noch 11-fache Stimulation des Reporter gens. Dagegen bewirkt die Überexpression von NCoR eine Reduktion der von Gemini vermittelten Stimulation des Reporter gens um den Faktor 3,6. Die Stimulation des Reporter gens beträgt bei Überexpression von NCoR und Stimulation mit Gemini nur noch das 4,2-fache. Dies bedeutet, daß in Gegenwart von NCoR die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermittelte Genaktivierung fast dreimal stärker ist als die durch Gemini vermittelte Genaktivierung.

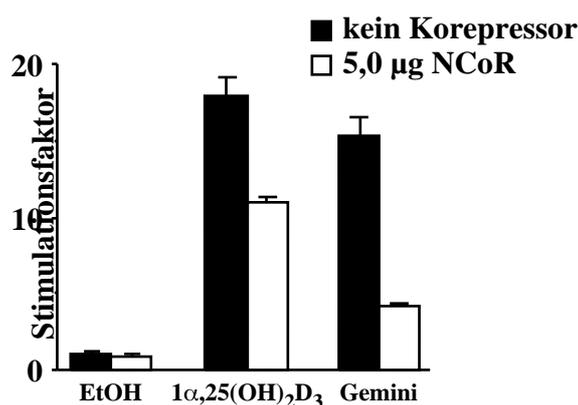


Abb. 29: Modulation der Ligand-vermittelten funktionellen Aktivität durch NCoR. Luciferase-Reporter gen-Assays wurden in Cos-7 durchgeführt, in denen mittels transierender Transfektion das $(\text{DR3})_4$ -LUC-Konstrukt sowie Expressionsvektoren für VDR, RXR (in allen Proben, schwarze Säulen) und NCoR (wie in der Abbildung angegeben, weiße Säulen) überexprimiert worden waren. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion mit 100 nM an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder Gemini für 16 Stunden stimuliert. Die Stimulation der auf die β -Galactosidase-Aktivität normierten Luciferase-Aktivitäten wurden in Bezug zur Ethanol-Kontrolle berechnet und als Stimulationsfaktoren angegeben. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert von Triplikaten, die Balken geben die Standardabweichung an.

3.3.9 Antagonistische Konformation des VDR: $c2_{\text{LPD}}$

Neben den Konformationen $c1_{\text{LPD}}$ und $c3_{\text{LPD}}$ gibt es eine weitere VDR-Konformation ($c2_{\text{LPD}}$), die durch einige Analoge wie z.B. ZK159222 induziert werden kann. ZK159222 zeichnet sich durch eine längere Seitenkette und eine zusätzliche Cyclopropyl-Gruppe aus. Die durch ZK159222 induzierten Konformationen des VDR wurden in DNA-

unabhängigen und DNA-abhängigen LPD-Assays (2.2.1.4) mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR und der Endoprotease Trypsin in Anwesenheit von sättigenden Konzentrationen an ZK159222 (10 μM) untersucht (**Abb. 30**).

Nach dem Proteaseverdau und der Auftrennung der Protein-Fragmente auf 15 %igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen erhält man neben den beiden Protease-resistenten Fragmenten (c1_{LPD} und c3_{LPD}) die auch mit 1,25(OH)₂D₃ erhalten wurden (**Abb. 25**), ein weiteres Protease-resistentes Fragment mit einer Molekularmasse von ungefähr 25 kD. Dieses Fragment repräsentiert die Konformation c2_{LPD}. Die Stabilisierung dieser Konformation erfolgt ausschließlich Ligand-abhängig, in der Ethanol-Kontrolle ist keine Stabilisierung der Konformation c2_{LPD} erkennbar. Bei sättigenden Konzentrationen an ZK159222 wurden bis zu 25 % des gesamten VDR in dieser Konformation stabilisiert. Aber auch ZK159222 stabilisiert den VDR überwiegend

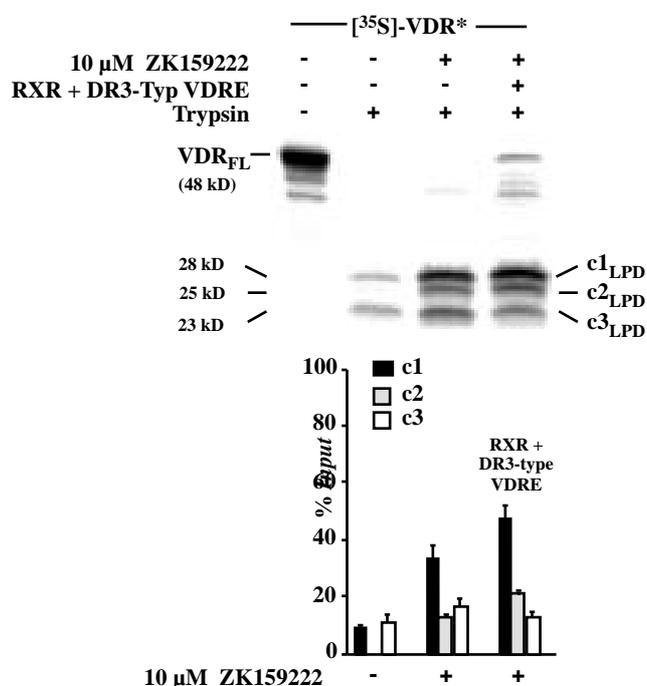


Abb. 30: ZK159222 stabilisierte Rezeptor-Konformationen. LPD-Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR, der mit sättigenden Konzentrationen an ZK159222 (10 μM) vorinkubiert worden war, durchgeführt. Trypsin wurde dazugegeben und die Proben wurden für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden durch 15 %ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Der Anteil an Ligand-stabilisiertem VDR in den Konformation c1_{LPD}, c2_{LPD}, und c3_{LPD} wurden in Relation zum VDR-Input im *Bioimager* quantifiziert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an.

in dieser Konformation. Aber auch ZK159222 stabilisiert den VDR überwiegend in der Konformation c1_{LPD} (bis zu 50 %). Die zusätzliche Bindung an DNA beeinflusst die Konformation c2_{LPD} kaum, in DNA-abhängigen Assays konnten nur geringe Unterschiede gezeigt werden.

3.3.10 Ligand-induzierte Blockade einer VDR-Koaktivator-Interaktion

Der Einfluß von ZK159222 und somit der Einfluß der Ligand-stabilisierten Konformation $c2_{LPD}$ auf die VDR-Koaktivator-Interaktion sollte *in vitro* im GST-Pulldown Assay untersucht werden.

Im GST-Pulldown Assays (2.2.1.9) mit GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Fusionsprotein und *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR konnte eine Ligand-induzierte VDR-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Interaktion des an 1,25(OH)₂D₃ gebundenen VDR gezeigt werden (**Abb. 31**). Hierbei konnten 18 % des VDR-Input präzipitiert werden. Dies weicht geringfügig von den unter 3.3.2 gezeigten Ergebnissen ab, was möglicherweise durch unterschiedliche Protein-Aufreinigungen erklärt werden kann. Mit dem an ZK159222 gebundenen VDR konnte dagegen keine Kofaktor-Interaktion beobachtet werden. ZK159222 vermittelte keine signifikant höhere VDR-Präzipitation als die Ethanol-Kontrolle (circa 2 %).

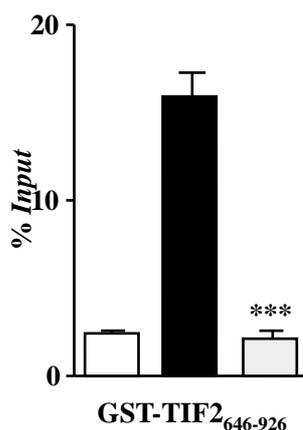
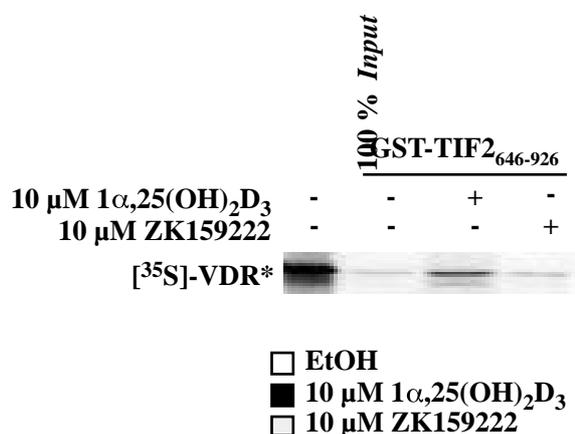


Abb. 31: ZK159222 stimuliert keine VDR-Koaktivator-Interaktion. GST-Pulldown Assays wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem VDR und bakteriell überexprimiertem GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ durchgeführt. Der VDR wurde für 20 min bei RT mit Ethanol, 10 µM 1,25(OH)₂D₃ oder 10 µM ZK159222 vorinkubiert. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem VDR im Verhältnis zum Input wurde im Bioimager quantifiziert. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von Triplikat-Messungen, die Balken geben die Standardabweichung an. *** steht für p < 0,0001 und bezieht sich auf den Wert von 1,25(OH)₂D₃.

3.3.11 Bedeutung der Ligand-induzierten Blockade der VDR-Koaktivator-Interaktion für ein *in vivo* System

Analoge, die keine Interaktion des VDR mit Koaktivatoren vermitteln wie es für ZK159222 gezeigt werden konnte, sollten *in vivo* keine Genaktivierung induzieren können.

Die VDR induzierte ZK159222-abhängige Aktivierung eines Luciferase-Reportergens wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe des *Mammalian-One-Hybrid-Assay* (2.2.2.2) untersucht. In den Zellen wurden mittels transients Transfektion das GAL4_{DBD}-VDR_{LBD}-Fusionsprotein und das (Gal4)₃-LUC-Konstrukt (2.1.7.4) überexprimiert und mit steigenden Konzentrationen an ZK159222 stimuliert. Die auf die Proteinmenge normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurden als Stimulationsfaktoren bezogen auf die Ethanol-Kontrolle dargestellt und gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen. Die Kurve zeigt, daß ZK159222 so gut wie keine Genaktivierung induzieren kann. Die Dosis-Wirkung ist gering (**Abb. 32**). ZK159222 induziert eine siebenmal geringe Aktivierung des Luciferase-Reportergens als 1 ,25(OH)₂D₃, mit einer nur 3-fachen Stimulation, während 1 ,25(OH)₂D₃ eine 22-fache Stimulation vermittelte (siehe 3.2.1). Der EC₅₀-Wert für ZK159222 betrug 120 nM, während für 1 ,25(OH)₂D₃ ein EC₅₀-Wert von 0,9 nM (ebenfalls 3.2.1) bestimmt worden war. ZK159222 stimuliert demnach nur ganz schwach die Genaktivität eines Reportergens.

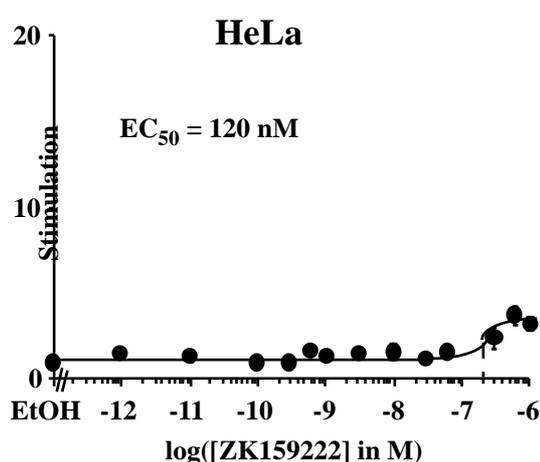


Abb. 32: Funktionelle Charakterisierung von ZK159222 im *Mammalian-One-Hybrid-System*. Luciferase-Reportergen-Aktivität wurde in HeLa-Zellextrakten bestimmt, die mittels transienten Transfektion das (Gal4)₃-LUC-Konstrukt sowie das GAL4_{DBD}-VDR_{LBD} Fusionsprotein überexprimierten. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an ZK159222 inkubiert. Die Stimulation der auf die Proteinmengen normalisierten Luciferase-Aktivitäten wurde in Bezug auf die Ethanol-Kontrolle berechnet. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von Triplikat-Messungen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Der EC₅₀-Wert der Ligand-induzierten Reportergen-Aktivität wurde aus der Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

3.3.12 Charakterisierung antagonistischer Effekte von ZK159222

Analoge, die kompetitiv zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind, jedoch nicht in der Lage sind, eine Genaktivierung zu vermitteln, werden als Antagonisten bezeichnet. Analoge die noch eine geringe Genaktivierung vermitteln, werden als Partial-Antagonisten bezeichnet.

Antagonistische Effekte von ZK159222 auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Genaktivierung wurden *in vivo* im Reporter-gen-Assay (2.2.2.2) in Cos-7 Zellen und *in vitro* im *Supershift-Assay* (2.2.1.3) genauer untersucht. In Cos-7 Zellen, wurden mittels transienter Transfektion VDR und RXR zusammen mit dem $(\text{DR3})_4$ -LUC-Konstrukt überexprimiert worden waren, wurden steigende Mengen ZK159222 gegen eine konstanten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration von 10 nM titriert. Die Luciferase-Aktivität wurde als Stimulationsfaktor bezogen auf die Ethanol-Kontrolle dargestellt und gegen die Ligand-Konzentration aufgetragen.

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß die Stimulation des Reportergens mit steigenden ZK159222 Konzentrationen sinkt (**Abb. 33A**). Ein 100-facher Überschuß an ZK159222 reduzierte die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Genaktivität von einem Stimulationsfaktor von 9 auf eine gerade mal 3-fache Stimulation. Die verbleibende Genaktivität ist dadurch bedingt, das es sich bei ZK159222 um einen Partial-Antagonisten handelt. Ein halbmaximaler antagonistischer Effekt von ZK159222 wurde bei einer zwei- bis dreifachen Konzentration an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beobachtet.

In *Supershift-Assays* (2.2.1.3d) mit GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆ vermittelten 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen *Supershift* des VDR-RXR-VDRE-Komplexen in den VDR-RXR-VDRE-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Komplex, während die Stimulation mit 10 μM ZK159222 zu keinem *Supershift* des VDR-RXR-VDRE-Komplexes führte (**Abb. 33B**). Eine Titration von ZK159222 gegen konstante Konzentrationen (10 nM) an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bewirkte eine deutliche Abnahme des VDR-RXR-VDRE-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Komplexes und eine damit einhergehende Zunahme des VDR-RXR-VDRE-Komplexes. Die Kombination von 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 10 μM ZK159222 resultierte in einer etwa gleich starken Ausbildung beider Komplexe.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß ZK159222 ein Partial-Antagonist ist. Ein hundertfacher Überschuß an ZK159222 reicht aus, um kompetitiv zum natürlichen Hormon zu wirken.

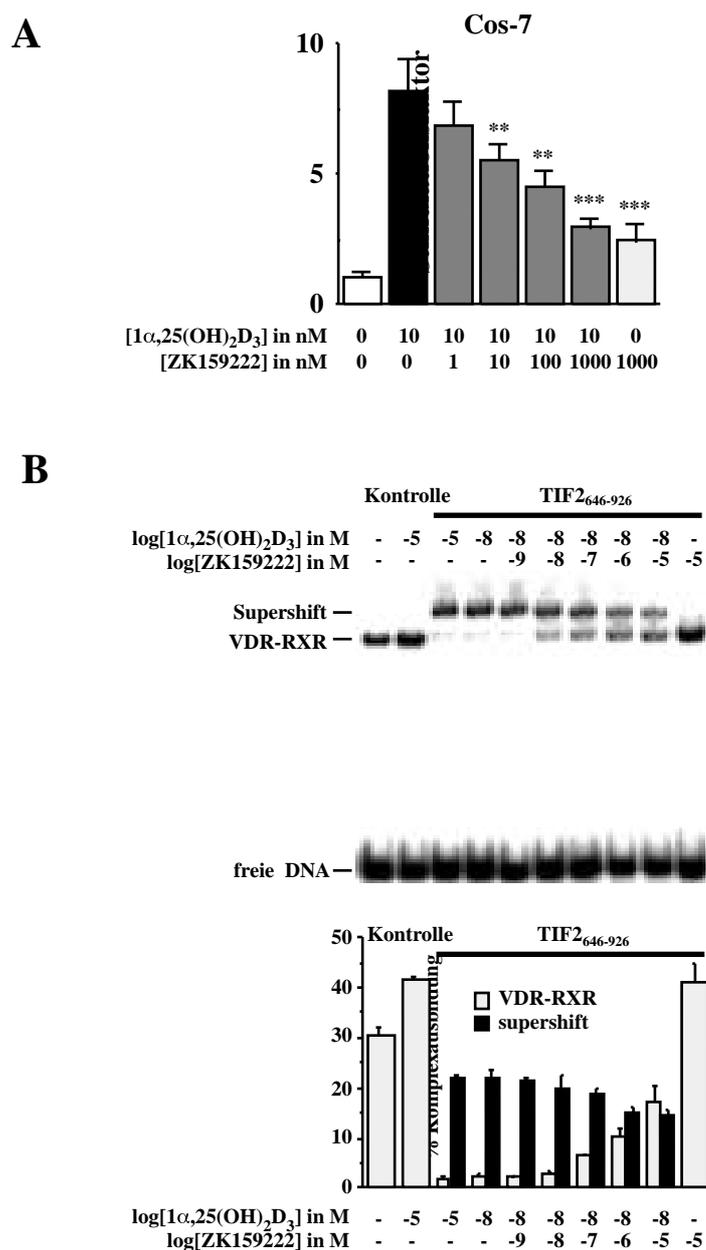


Abb.: 33: Dosis-Abhängigkeit des antagonistischen Effektes von ZK159222 *in vivo* und *in vitro*. Luciferase-Reportergen-Assays (A) wurden mit Cos-7 Zellextrakten durchgeführt, die transient mit dem (DR3)₄-LUC-Konstrukt und den Expressionskonstrukten für VDR und RXR transfiziert worden waren. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion mit konstanten Konzentrationen an 1 α ,25(OH)₂D₃ (10 nM) und steigenden Konzentrationen an ZK159222 für 16 Stunden stimuliert. Die Stimulation der auf die β -Galactosidase-Aktivität normierten Luciferase-Aktivitäten wurden in Bezug zur Ethanol-Kontrolle berechnet und als Stimationsfaktoren angegeben. *Supershift-Assays* (B) wurden mit *in vitro* translatierten VDR-RXR-Heterodimeren, die mit etwa 3,0 μ g bakteriell exprimiertem GST-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Fusionsprotein bei sättigenden Konzentrationen an 1 α ,25(OH)₂D₃ (10 nM) und steigenden Konzentrationen an ZK159222 vorinkubiert und anschließend mit [³²P]-markiertem DR3-Typ VDRE des Ratten ANF-Promotors weiter inkubiert. Die Trennung der VDR-RXR-VDRE- bzw. der VDR-RXR-VDRE-TIF2₆₄₆₋₉₂₆-Komplexe von der freien DNA erfolgte durch 8 %ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgele. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. Die Menge an VDR-RXR-VDRE- (graue Balken) oder VDR-RXR-VDRE-Kofaktor-Komplexen (*Supershift*; schwarze Balken) im Verhältnis zur freien DNA wurde im *Bioimager* quantifiziert. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert von Triplikaten, die Balken geben die Standardabweichung an. *** steht für $p < 0,0001$ und ** steht für $p < 0,001$ bezogen auf den 1 α ,25(OH)₂D₃-Wert

4. Diskussion

4.1 Interaktion des VDR mit Korepressoren - Das Modell der VDR-vermittelten Genrepression

VDR-RXR-VDRE-Komplexe stellen den Ausgangspunkt für multiple $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Signalwege dar. Sie werden als Grundlage für den molekularen Mechanismus der Genregulation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Genen verstanden. Die Regulation der Expression dieser Gene erfolgt über Interaktion des VDR mit Kofaktoren. Dabei ist es wichtig, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierte Gene in Abwesenheit von Ligand ausgeschaltet sind.

Für ein Verständnis der Genrepression von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Genen sind Untersuchungen zur Interaktion des VDR mit Korepressoren von Bedeutung, da die Repression möglicherweise durch Interaktion des VDR mit Korepressoren bedingt ist.

Im Reportergen-*Assay* konnte unter *in vivo* Bedingungen gezeigt werden, daß der VDR über intrinsische repressorische Aktivität verfügt. Da diese sensitiv gegenüber dem Histon-Deacetylase-Inhibitor TSA ist, erfolgt demnach die VDR-vermittelte Repression über den etablierten Sin3-HDAC-Weg (**Abb. 34**). Histon-Deacetylasen und Chromatinverdichtung sind an der Repression von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Genen beteiligt. Auf dem natürlichen, komplexen VDRE aus dem Promotor des humanen Osteocalcin-Gens ist die intrinsische repressorische Eigenschaft des VDR schwächer, als für anderer nukleärer Rezeptoren der Klasse II wie z.B. für T_3R und RAR gezeigt wurde [80; 83]. Im *Mammalian-One-Hybrid*-System dagegen zeigte der VDR im direkten Vergleich mit dem T_3R deutlich stärker repressorische Eigenschaften [136]. Vom komplexen VDRE war bekannt, daß der VDR auf diesem Element sowohl als Homo- als auch als Heterodimer binden kann [139; 140]. Die Überexpression des Partnerrezeptors RXR hatte jedoch keinen Einfluß auf die Repression des komplexen VDREs. Diese Befunde deuten daraufhin, daß eine VDR-vermittelte Repression nicht nur durch VDR-RXR-Heterodimere, sondern auch durch andere VDR-beinhaltende Komplexe wie zum Beispiel den VDR-VDR-Homodimer und den VDR-RAR-Heterodimer bewirkt werden können.

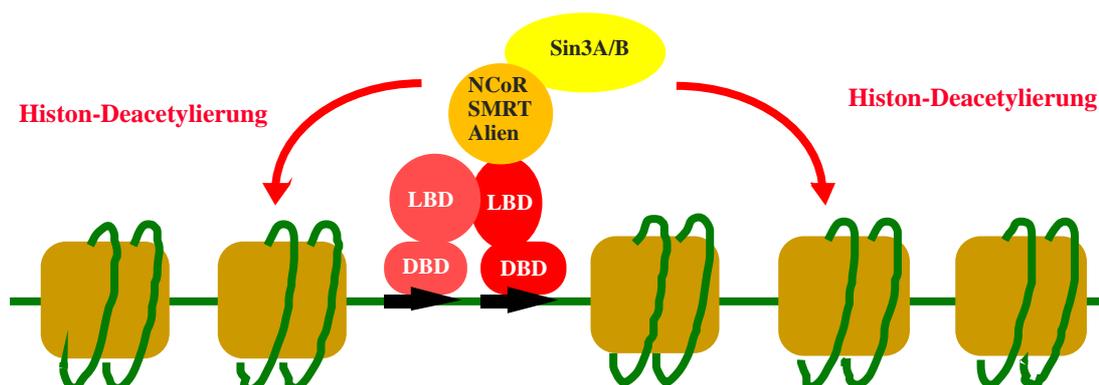


Abb. 34: Modell der Repression von Hormon-regulierter Gene. Dargestellt ist der als Sin3-HDAC-Weg bezeichnete Weg der Repression von Genen. Der nukleäre Rezeptor interagiert in Abwesenheit von Ligand mit Korepressoren. Diese Proteine können ihrerseits mit Histondeacetyltransferasen interagieren. Deacetylierung von Histonen führt zu einer Chromatinverdichtung.

Nach dem gängigen Modell der VDR vermittelten Repression bindet der VDR als Homo- oder Heterodimer an das VDRE und in Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kommt es zur Interaktion des Rezeptor-Komplexes mit Korepressoren (Abb. 34). Die Korepressoren interagieren mit Histondeacetyltransferasen, die Deacetylierung von Histonen bewirkt eine stärkere Kondensation des Chromatins. Dadurch ist eine Transkription des Gens nicht möglich.

Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem VDR und den beiden untersuchten Korepressoren NCoR und Alien konnte nachgewiesen werden (Abb. 15). Diese Interaktion ist Ligand-abhängig in Sinne einer VDR-Korepressor-Dissoziation bei steigenden Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Abb. 16A). Die beobachtete VDR-NCoR-Interaktion war etwa 3-4 mal schwächer als die bekannte T_3R -NCoR-Interaktion [136]. Interessanterweise konnte auch erstmalig eine VDR-Alien-Interaktion nachgewiesen werden. Alien ist ein deutlich kleinerer Korepressor (34 kD) als NCoR und SMRT und zeigt keine erkennbaren Homologien zu diesen. Von Alien war bekannt, daß er mit T_3R und dem Ecdyson-Rezeptor, jedoch nicht mit dem RAR interagieren kann [84]. Die Interaktion von VDR mit Alien war in etwa genauso stark wie die T_3R -Alien Interaktion [136].

Auf der Ebene der Protein-Protein-Interaktion zeigte sich die VDR-Alien-Interaktion zwar schwächer als die VDR-NCoR-Interaktion, funktionell konnte aber kein Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Korepressoren festgestellt werden (Abb. 16B). Die Interaktion zwischen VDR und Alien scheint sogar geringfügig effektiver zu sein, da

sowohl *in vivo* als auch *in vitro* höhere $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen benötigt wurden, um den VDR-Alien-Komplex zu dissoziieren (**Abb. 16A/B**).

Der VDR-RXR-Heterodimer scheint hauptsächlich über den VDR mit Korepressoren zu interagieren. Eine Interaktion zwischen RXR und NCoR konnte zwar nachgewiesen werden, diese war allerdings deutlich schwächer als die VDR-NCoR-Interaktion [84]. Auch die *in vivo* Daten aus dem Reporter-Gen-Assay (3.1.1) bestätigen, daß der RXR keinen Einfluß auf die Repression des Reportergens hat.

Ligand-Bindung des VDR führt zu einer Konformationsänderung von H12 und vor allem zu einer Konformationsänderung der als AF2-Domäne bezeichneten Transaktivierungsfunktion des Rezeptors. Daher bestand die hypothetische Annahme, daß die Aminosäuren der AF2-Domäne Einfluß auf die Ligand-induzierte Dissoziation des VDR-Korepressor-Komplexes haben könnten. Die Untersuchungen mit einer VDR-Mutante, der die AF2-Domäne fehlte ($\text{VDR}_{413\text{stop}}$), ergaben aber, daß die AF2-Domäne keinen Einfluß auf die VDR-Korepressor-Interaktion oder die Ligand-induzierte Dissoziation des VDR-Korepressor-Komplexes hat (**Abb. 17**).

Neuere Ergebnisse zeigen, daß für die Interaktion nukleärer Rezeptoren mit NCoR eine als CoR-Box bezeichnete Region hoch konservierter Aminosäuren in H1 wichtig zu sein scheint [80]. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit dem $\text{VDR}_{\text{CoR-Box}}$ zeigten aber keine deutlichen Beweise dafür, daß diese Aminosäuren tatsächlich für die Interaktion mit den Korepressoren von Bedeutung sind (Daten nicht gezeigt). Andere Aminosäuren in H1 sowie in H10 und H11 werden diskutiert, zur Zeit sind die an der Rezeptor-Korepressor-Interaktion beteiligten Aminosäuren aber noch nicht bekannt.

Die Ligand-Bindung an den Rezeptor induziert darauf folgend die Korepressor-Dissoziation. Eine vollständige Dissoziation des VDR-Korepressor-Komplexes bei sättigenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen konnte allerdings weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte sein, daß es zwei verschiedene Typen von VDR-Korepressor-Komplexen gibt. Bei dem einen Typ reagiert der VDR auf den Liganden und es kommt zur Dissoziation des VDR-Korepressor-Komplexes. Bei dem anderen Typ ist der VDR möglicherweise durch den Korepressor so blockiert, daß er nicht auf den Liganden reagieren kann. Dieser VDR-RXR-VDRE-Komplex kann dann nicht an Ligand-induzierten Prozessen wie der Interaktion mit Koaktivatoren teilnehmen. Ähnliches konnte für den RAR-RXR-Komplex auf einem DR1-Typ responsiven Element gezeigt werden [141]. Solche VDR-Korepressor-Komplexe könnten an der Ligand-induzierten Repression von Genen beteiligt sein wie sie für das PTH-Gen gezeigt werden konnte [123].

Die Untersuchungen zur VDR-vermittelten Genrepression zeigen, daß der VDR über intrinsische repressorische Eigenschaften verfügt. 1 ,25(OH)₂D₃-regulierten Gene werden durch Interaktion des VDR mit Korepressor unter Beteiligung von Histon-Deacetylasen reprimiert. Die AF2-Domäne ist an der Korepressor-Interaktion des VDR nicht beteiligt. Ein Teil der VDR-Korepressor-Komplexe dissoziiert nicht bei Ligand-Zugabe.

4.2 Interaktion des VDR mit Koaktivatoren - Das Modell der VDR-vermittelten Genaktivierung

Die Signalübertragung von nukleären Hormonen ist ein spezifischer und direkter Weg der Genregulation. Sie erfolgt durch Bindung des Liganden an den nukleären Rezeptor. Der Ligand-gebundene Rezeptor bewirkt durch Interaktion mit Koaktivatoren eine Genaktivierung der entsprechenden Hormon-regulierten Gene. VDR-Koaktivator-Komplexe stellen somit die Grundlage für ein Verständnis der Expression von 1 ,25(OH)₂D₃-regulierten Genen dar.

Im *Mammalian-One-Hybrid-Assay* mit der VDR-LBD konnte gezeigt werden, daß die Ligand-Bindung der LBD ausreicht, um eine transaktivierende Wirkung zu erzeugen. Für 1 ,25(OH)₂D₃ konnte eine Stimulation des Reportergens um das 22-fache beobachtet werden. Diese Stimulation ist dadurch bedingt, daß der VDR mit Koaktivatoren interagieren kann. Eine VDR-Koaktivator-Interaktion konnte in DNA-unabhängigen und DNA-abhängigen *Assays* nachgewiesen werden. Die Interaktion des VDR mit verschiedenen Mitgliedern der SRC-Familie (SRC-1, TIF2 und RAC3) zeigte keine signifikanten Unterschiede. *In vivo* können sich die Kofaktoren gegenseitig ersetzen [127].

Die VDR-Koaktivator-Interaktion ist wie bei allen anderen nukleären Rezeptoren strikt Ligand-abhängig [129]. Die Aminosäuren des VDR, die an einer direkten Interaktion mit den Koaktivatoren beteiligt sind, waren bereits früher identifiziert worden [129]. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren L417, E420 und F422, die sich in der AF2-Domäne des VDR befinden. Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die VDR-Kofaktor-Interaktion konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (**Abb. 21**). Die strikte Ligand-Abhängigkeit der Kofaktor-Interaktion ist dadurch bedingt, daß die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren nur im Ligand-gebundenen Zustand exponiert sind. Diese essentiellen Aminosäuren der AF2-Domäne sind innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren hoch konserviert.

Mittlerweile konnten weitere Aminosäuren im VDR identifiziert werden, die für die VDR-Koaktivator-Interaktion von Bedeutung sind. Es handelt sich um die Aminosäuren Y236 [142] und K246 [143], die beide in H3 liegen. Hierbei handelt es sich um Aminosäuren, die nicht in allen nukleären Rezeptoren konserviert sind. Interaktionspunkte außerhalb der AF2-Domäne erklären vielleicht auch, warum mehrere LXXLL-Motive in den Kofaktoren zu finden sind und warum unterschiedliche LXXLL-Motive für die Interaktion mit verschiedenen nukleären Rezeptoren von Bedeutung sind [68; 144].

Die Fähigkeit von VDR-RXR-Heterodimeren, mit unterschiedlich strukturierten VDREs zu interagieren, erfordert bei den Koaktivatoren hohe Flexibilität. Diese Flexibilität scheint jedoch gewährleistet zu sein, denn es konnten keine Unterschiede in der Interaktionsfähigkeit zwischen verschiedenen VDR-RXR-VDRE-Komplexen und den Kofaktoren der SRC-Familie gefunden werden [145].

Das gängige Modell der Ligand-induzierten Aktivierung von Hormon-regulierten Genen ist zur Zeit das folgende: Die Ligand-Bindung des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung der LBD samt AF2-Domäne. Diese Konformationsänderung bewirkt, daß die bisher verborgenen Aminosäuren in der AF2-Domäne exponiert werden und damit für Kofaktoren zugänglich sind. Die Interaktion der Kofaktoren mit Histon-Acetylasen wie z.B. CBP/p300 oder p/CAF bewirkt eine Öffnung des Chromatins (**Abb. 35**).

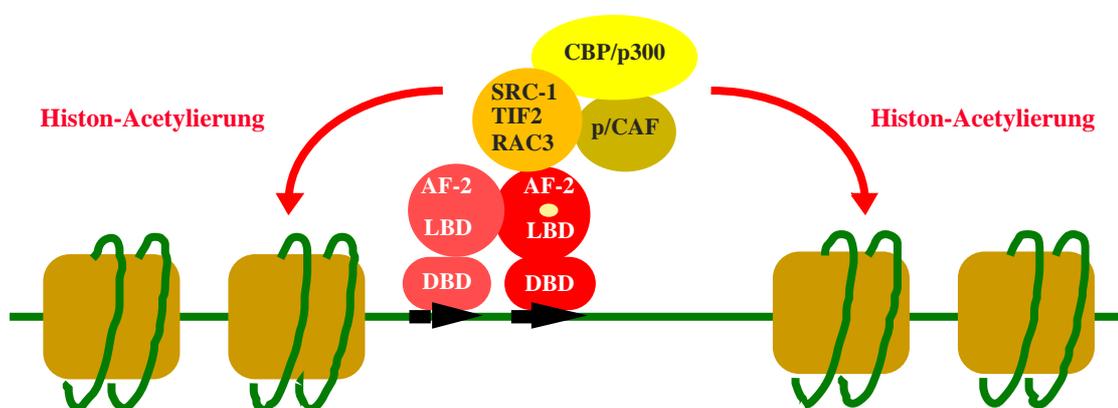


Abb. 35: Modell der Ligand-induzierten Aktivierung der Transkription von Hormon-regulierten Genen - erster Schritt. Hierbei handelt es sich um den ersten Schritt der Genaktivierung. Nach der Ligand-induzierten Konformationsänderung der LBD kommt es zur Interaktion des Rezeptors mit Kofaktoren. Diese interagieren dann ihrerseits mit Proteinen, die über Histon-Acetylaseaktivität verfügen. Durch die Acetylierung der Histone kommt es zur Öffnung des Chromatins.

Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß der VDR und andere nukleäre Rezeptoren im Ligand-gebundenen Zustand mit einem aus bis zu 15 Proteinen bestehenden Komplex [146] interagieren. Dieser Komplex wurde als DRIP- (vitamin D₃ receptor interacting proteins, [68; 144; 147; 148]) oder TRAP- (thyroid receptor activating proteins, [149]),

Komplex bezeichnet. Dieser Komplex beinhaltet erstaunlicherweise nicht die Koaktivatoren der SRC-Familie.

Der DRIP/TRAP-Komplex bindet Ligand-abhängig über eine einzige Untereinheit (DRIP205 bzw. TRAP220) an die Rezeptoren. Die beiden Proteine DRIP205 und TRAP220 sind identisch. Sie verfügen wie die Proteine der SRC-Familie über LXXLL-Motive, mittels derer sie mit den nukleären Rezeptoren interagieren. Die Interaktion nukleärer Rezeptoren mit dem DRIP/TRAP-Komplex erfolgt über die stark konservierten Aminosäuren der AF2-Domäne. Im DRIP-Komplex konnte keine HAT-Aktivität nachgewiesen werden, demnach ist der Komplex nicht an der Modulation des Chromatins beteiligt. Es wird daher angenommen, daß es nach der Öffnung des Chromatins durch die Proteine der SRC-Familie zu einem Austausch des Koaktivator-Komplexes kommt. Einige der Proteine waren bereits als Mediator/Srb-Proteine identifiziert. Diese Proteine interagieren direkt mit den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie. Es war daher nicht erstaunlich, daß eine Interaktion des DRIP/TRAP-Komplexes mit der RNA-Polymerase II nachgewiesen werden konnte [150; 151].

Das Modell der Genregulation Hormon-regulierter Gene wird um einen weiteren Schritt ergänzt (**Abb. 36**). Während die Aufgabe der Proteine der SRC-Familie in einer Ligand-abhängigen Öffnung des Chromatins zu liegen scheint, hat der zweite Komplex die Aufgabe eine Interaktion mit der RNA-Polymerase II zu vermitteln. Die Faktoren, die den Austausch der Koaktivatoren bedingen, und der Mechanismus dieses Austausches sind bislang unbekannt.

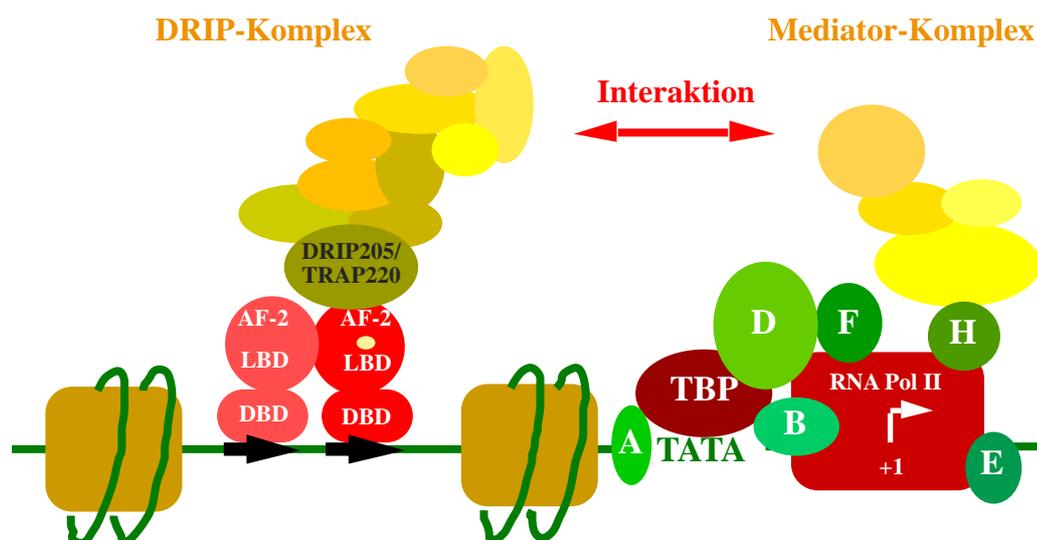


Abb. 36: Modell der Ligand-induzierten Aktivierung der Transkription von Hormon-regulierten Genen - zweiter Schritt. Nach der Öffnung des Chromatins interagiert der VDR immer noch Ligand-abhängig über das DRIP205-Protein mit dem DRIP-Komplex. Dieser Komplex vermittelt die Interaktion zu den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie und der RNA-Polymerase II.

Die Untersuchungen zur VDR-vermittelten Genaktivierung zeigen, daß Ligand-gebundenen VDR durch Interaktion mit Koaktivatoren die Expression von 1,25(OH)₂D₃-regulierten Genen bewirkt. Ligand-induzierte Kofaktor-spezifische Interaktionen konnten nicht nachgewiesen werden. Liganden haben allerdings einen stark modulativen Einfluß auf die VDR-Koaktivator-Interaktion. Für Gemini konnte gezeigt werden, daß dieses Analog bei einer Kofaktor-Überexpression eine deutlich höhere Genaktivität vermittelt.

4.3 Modulation der VDR-Konformationen

Der Schritt der Ligand-Bindung ist für den gesamten Vorgang der Aktivierung der Transkription von Hormon-regulierten Gene sehr kritisch, da damit eine Konformationsänderung der LBD einher gehen muß. Diese Konformationsänderung induziert die Dissoziation des Korepressors und ermöglicht die Interaktion mit verschiedenen Koaktivatoren. Daher ist der Ligand-gebundene Rezeptor das Hauptinteresse von endokrinologischen und pharmakologischen Untersuchungen.

Der limitierte Proteaseverdau (LPD) ist ein sehr effektiver *Assay*, um auf molekularer Ebene die Ligand-induzierten Konformationsänderungen des Rezeptors zu verstehen. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß Untersuchungen der funktionellen Konformationen (**Abb. 25**) an sich in Lösung befindenden monomeren VDR-Molekülen manchmal zu ineffizient sind, um auf das genregulatorische Potential eines Analoges Rückschlüsse zuzulassen wie hier am Beispiel des Modell-Analogs Gemini gezeigt werden konnte. Gemini zeigt in DNA-unabhängigen *Assays* wie dem LPD oder dem *GST-Pulldown Assay* das Profil eines schwachen Agonisten (bis zu 100-fach schwächer als das natürliche Hormon 1,25(OH)₂D₃). In funktionellen und damit DNA-abhängigen Untersuchungen wie dem Reporter-*Assay* (**Abb. 22**) oder dem *Mammalia-One-Hybrid-Assay* [145], war Gemini jedoch deutlich potenter als das natürliche Hormon. Gemini stabilisiert in Lösung befindende VDR-Monomere ausschließlich in Konformation c3_{LPD}, welche als die gering-affine VDR-Konformation charakterisiert worden war [152]. Im Gegensatz dazu stabilisieren 1,25(OH)₂D₃ und andere potente VDR-Agonisten [z.B. 20-epi 1,25(OH)₂D₃ (MC1288) und 20-methyl 1,25(OH)₂D₃ (ZK161422)] den Rezeptor bevorzugt in der hoch-affinen Konformation c1_{LPD}.

Für einige Analoge wie z.B. Gemini bestand eine Diskrepanz zwischen DNA-unabhängigen und DNA-abhängigen *Assays*. Um den Einfluß von DNA und Kofaktoren

auf die Ligand-induzierten Konformationen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der traditionelle LPD dahingehend modifiziert, daß er in Anwesenheit von Partnerrezeptor, VDRE und Kofaktor durchgeführt wurde. Der modifizierte LPD erwies sich als sehr effektiv, um den Einfluß des VDR-RXR-VDRE-Komplexes auf die Ligand-stabilisierten Rezeptor-Konformationen zu untersuchen (**Abb. 26**). Im modifizierten LPD mit VDR-RXR-Heterodimeren in Gegenwart eines VDREs konnte für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Zunahme der Ligand-Sensitivität für $c1_{\text{LPD}}$ um einen Faktor von 13 beobachtet werden. Es erfolgte keine Ligand-induzierte Stabilisierung der VDR-Moleküle in Konformation $c3_{\text{LPD}}$. Für Gemini konnte eine Zunahme der Sensitivität für Konformation $c3_{\text{LPD}}$ gezeigt werden, es wurden aber deutlich weniger VDR-Moleküle in dieser Konformation stabilisiert. Der überwiegende Anteil der VDR-Moleküle (ca. 60 %) wurde in der Konformation $c1_{\text{LPD}}$ stabilisiert. Demnach ist Gemini sehr gut in der Lage, den VDR in der hoch-affinen Konformation $c1_{\text{LPD}}$ zu stabilisieren; dies allerdings nur, wenn der VDR als Heterodimer gebunden an ein VDRE vorliegt. Diese Befunde könnten eine Erklärung dafür sein, warum Gemini in DNA-abhängigen *in vitro Assays* wie dem *Gelshift-Assay* (**Abb. 24**) oder dem *Gelshift-Clipping-Assay* [145] als genauso potent wie das natürliche Hormon ist. Die Stabilisierung des heterodimeren Komplexes auf einem VDRE unterstützt anscheinend eine Stabilisierung der Konformation $c1_{\text{LPD}}$, wodurch schwache Agonisten potenter werden.

Auch der Einfluß von Kofaktoren auf die Konformation des VDR wurde untersucht. Die Anwesenheit von SRC-1 bewirkte, daß bei der durch Gemini-induzierten Rezeptor-Konformation keine Stabilisierung des VDR in $c3_{\text{LPD}}$ erfolgt. Ein Einfluß der Koaktivatoren auf die Ligand-Sensitivität konnte dagegen nicht festgestellt werden. Auf die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierte VDR-Konformationen hat die Anwesenheit eines Koaktivators ebenfalls keinen Einfluß. Kofaktoren scheinen demnach hauptsächlich einen stabilisierenden und keinen modulierenden Einfluß auf die Konformation $c1_{\text{LPD}}$ zu haben. Eine Stabilisierung der Konformation $c1_{\text{LPD}}$ durch die heterodimere Komplexbildung reicht demnach aus, um einen schwachen Agonisten in einen potenten Agonisten zu verwandeln.

Im Reporter-Gen-Assay resultierte die Überexpression von TIF2 in einer 36-fachen Zunahme der Ligand-Sensitivität für Gemini (**Abb. 22**). Diese Ergebnisse zeigen, daß für einige Analoge wie z.B. das Modell-Analog Gemini die Komplexbildung des VDR-RXR-Heterodimers auf dem VDRE hauptsächlich für die Interaktion mit Kofaktoren verantwortlich ist. Dadurch kann auch die Diskrepanz zwischen dem Ergebnissen des *GST-Pulldown* und des *Supershift-Assays* erklärt werden. Im DNA-unabhängigen *GST-Pulldown Assay* war Gemini nur schwach in der Lage, eine VDR-Koaktivator-Interaktion

zu vermitteln (**Abb. 23**), während im *Supershift-Assay* kein Unterschied zwischen Gemini und anderen guten Agonisten aufgezeigt werden konnte (**Abb. 24**, [145])

Die Untersuchungen mit den verschiedenen Koaktivatoren der SRC-Familie ergaben, daß keine Kofaktor-Selektivität der verschiedenen verwendeten Agonisten nachgewiesen werden konnte.

Untersuchungen zu dem modulativen Einfluß eines Korepressors auf die Ligand-induzierten Konformationen des VDR ergaben, daß der Korepressor die Sensitivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Konformation $c1_{\text{LPD}}$ zu stabilisieren um einen Faktor von fünf deutlich erniedrigt. In Anwesenheit eines Korepressors kommt es bei Gemini nicht nur zu einer Abnahme der Ligand-Sensitivität, sondern es kommt auch zu einer drastischen Änderung der stabilisierten Rezeptor-Konformation. Es erfolgt überhaupt keine Ligand-abhängig Stabilisierung der VDR-Moleküle in Konformation $c1_{\text{LPD}}$, sondern alle VDR-Moleküle werden in der Konformation $c3_{\text{LPD}}$ stabilisiert. Im Fall von Gemini ist der Korepressor in der Lage, die durch das VDRE erfolgte Stabilisierung der Konformation $c1_{\text{LPD}}$ wieder aufzuheben. Möglicherweise wird dies durch eine nur sehr schwach induzierte Rezeptor-Korepressor-Dissoziation bewirkt (**Abb. 28**). Gemini induzierte im *Supershift-Assay* im Vergleich zu dem natürlichen Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ deutlich schwächer eine Ligand-abhängige NCoR-Dissoziation vom VDR-RXR-VDRE-Komplex. Da Gemini nur eine schwache VDR-Korepressor-Dissoziation induziert und den Rezeptor bevorzugt in der Konformation $c3_{\text{LPD}}$ stabilisiert, führt die Überexpression eines Korepressors bei einer durch Gemini-vermittelten Genaktivität zu einer deutlich verminderten Genexpression. NCoR hat dadurch einen vermindernenden Effekt auf die Gemini-induzierte Genexpression (**Abb. 29**). In den hierzu durchgeführten Untersuchungen zur Ligand-induzierten Korepressor-Dissoziation (**Abb. 29**) konnte wiederholt gezeigt werden, daß der VDR-NCoR-Komplex auch bei hohen Ligand-Konzentrationen nicht vollständig dissoziiert, was im Gegensatz zu dem gängigen Modell der Hormon-induzierten Genexpression steht (**Abb. 35**). In diesem Modell wird eine vollständige Dissoziation des VDR-Korepressor-Komplexes bei hohen Ligand-Konzentration postuliert [53].

Bislang wurden die traditionellen Ligand-Bindestudien mit monomeren, sich in Lösung befindlichen VDR-Molekülen durchgeführt. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen klar, daß eine möglichst genaue Charakterisierung von Analogen *in vitro* nur dann gewährleistet ist, wenn auch der Einfluß des VDREs und der Kofaktoren berücksichtigt wird. Einige als schwache Agonisten klassifizierte Analoge könnten sich in *in vivo* Untersuchungen oder dem modifizierten LPD als ebenso potent wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erweisen.

Die Ergebnisse, daß Agonist-gebundene VDR-Moleküle mit Korepressoren interagieren können und diese Komplexe dann nicht an der Ligand-induzierten Genaktivität

teilnehmen, zeigt, daß den Agonisten eine neue Aufgabe zukommt. Demnach können sie auch eine Rolle bei der Ligand-induzierten Genrepression von Bedeutung sein.

Die Ligand-stabilisierten VDR-Konformationen werden durch eine heterodimere Komplexbildung und die Anwesenheit von Korepressoren in den stabilisierten Konformationen und bezüglich der Ligand-Sensitivität moduliert. Koaktivatoren haben dabei einen stabilisierenden Einfluß auf die agonistische VDR-Konformation.

4.4 Ligand-induzierte Blockade der VDR-Koaktivator-Interaktion

Es sind nur wenige Analoge bekannt, die den VDR in Konformation $c2_{LPD}$ stabilisieren können. Eines davon ist ZK159222 (**Abb. 30**). ZK159222 ist in der Lage, Dosis-abhängig bis zu 60 % der VDR-Moleküle in der Konformation $c2_{LPD}$ zu stabilisieren [153]. ZK159222 zeigt das Profil eines schwachen Agonisten, der in *Gelshift-Assays* eine etwa 7-fach höhere Ligand-Konzentration benötigt, um VDR-RXR-Heterodimere auf einem VDRE zu stabilisieren [154]. ZK159222 vermittelt jedoch keine DNA-unabhängigen oder DNA-abhängigen Interaktionen des VDR mit Koaktivatoren [154]. Die fehlende Koaktivator-Interaktion des ZK159222-gebundenen VDR ist auch die Ursache für die sehr geringe Reporter-gen-Aktivität, die durch ZK159222 induziert wird. Im *Mammalian-One-Hybrid-Assay* wurde nur eine 3-fache Stimulation des Reporter gens durch ZK159222 erreicht, während für $1,25(OH)_2D_3$ ein Stimulationsfaktor von 22 bestimmt wurde. Diese geringe Stimulation des Reporter gens konnte ebenfalls in Cos-7 und MCF-7 Zellen bestätigt werden [154].

Die Kombination von sättigenden Konzentrationen $1,25(OH)_2D_3$ und einem 100-fachen Überschuß an ZK159222 zeigten einen signifikanten antagonistischen Effekt. Ein 100-facher Überschuß an ZK159222 reicht, trotz schwächerer Bindungsaffinität an den VDR, aus, um kompetitiv zum natürlichen Hormon zu wirken. Die Konkurrenz erfolgt, indem ZK159222 an die meisten VDR-Moleküle bindet und so bewirkt, daß weniger VDR-Moleküle mit Koaktivatoren interagieren können (**Abb. 33**).

Die Interaktion des VDR mit Kofaktoren hängt von der AF2-Domäne ab (Kap. 1.3). Der Vergleich der Kristallstrukturen von Agonist- und Antagonist-gebundenen Rezeptoren wie z.B. ER, zeigt, daß der Antagonist die Funktion der AF2-Domäne behindert, indem er die

Ausrichtung der AF2-Domäne nicht gewährleistet [49]. In Analogie hierzu würde man ähnliches für den VDR erwarten. ZK159222 würde demnach die AF2-Domäne des VDR in einer Position stabilisieren, die keine Koaktivator-Interaktion ermöglicht [155].

Die Konformation des durch den Antagonisten stabilisierten VDR müßte sich von der agonistischen Rezeptor-Konformation unterscheiden. Die Vermutung lag nahe, daß es sich hierbei um Konformation $c2_{LPD}$ handeln könnte. Untersuchungen an ZK159222 strukturell verwandten Analogen haben ergeben, daß nicht alle dieser Analoge eine antagonistische Aktivität zeigen. Aber es konnte eine Korrelation zwischen der antagonistischen Eigenschaft eines Analoges und der Fähigkeit, den Rezeptor in Konformation $c2_{LPD}$ zu stabilisieren, aufgezeigt werden [153]. Möglicherweise behindert die lange Seitenkette des Analoges eine agonistische Positionierung der AF2-Domäne. Dies läßt ein generelles Prinzip vermuten, bei dem es zu einer Ligand-induzierten Dispositionierung der AF2-Domäne kommt, die eine Rezeptor-Kofaktor-Interaktion blockieren würde.

Der hier beschriebene Mechanismus der AF2-Domänen-Dispositionierung für eine antagonistische Wirkung eines Analoges muß nicht der einzig mögliche sein. Es sind weitere Mechanismen vorstellbar wie z.B. eine Inhibition der VDR-RXR-Heterodimer Komplexbildung wie sie für das 23,26-Lacton 1 ,25(OH)₂D₃-Analog TEI-9647 postuliert wurde [156]. Denkbar wäre auch ein Mechanismus, bei dem das Analoge nicht in der Lage wäre, eine Korepressor-Dissoziation zu induzieren.

Antagonismus wird durch eine Ligand-induzierte Blockade der VDR-Koaktivator-Interaktion bewirkt. Der Antagonist-gebundener VDR ist nicht in der Lage mit Koaktivatoren zu interagieren. Vermutlich erfolgt die Blockade der Koaktivator-Interaktion über eine Dispositionierung der AF2-Domäne durch den Liganden. Die Bindungsaffinität des Antagonisten ist zwar geringfügig schwächer, als die des natürlichen Liganden, dennoch ist eine Kompetition möglich.

4.5 Bedeutung der funktionellen Konformationen des VDR und ihre physiologische Relevanz

Eine Charakterisierung der Ligand-stabilisierten VDR-Konformationen und eine Zuordnung der Konformationen zu ihrer physiologischen Relevanz erleichtert das Verständnis der Ligand-induzierten Genregulation. Von besonderer Bedeutung ist die

Charakterisierung der Ligand-induzierten VDR-Konformationen außerdem für die Suche nach Analogen, die potentiell von therapeutischen Interesse sind.

Der Ligand-stabilisierten Konformation $c2_{LPD}$ konnte eine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um die antagonistische Konformation des Rezeptors. Die Dispositionierung der AF2-Domäne erlaubt keine Interaktion mit den LXXLL-Motiven der Koaktivatoren und somit erfolgt keine bzw. nur eine geringe Expression des Reportergens (**Abb. 32**). Es konnte mittlerweile gezeigt werden, daß der VDR auch in lebenden Zellen in dieser antagonistischen Konformation stabilisiert wird. Die verbleibende, restliche agonistische Aktivität des Antagonisten ZK159222 (Partial-Antagonisten) ist auf den Einfluß der AF2-Domäne des RXR zurückzuführen [157].

Die Stabilisierung der Konformation $c2_{LPD}$ durch $1,25(OH)_2D_3$ -Analoge stellt allerdings eine Besonderheit dar, wodurch die Konformationen $c1_{LPD}$ und $c3_{LPD}$ von zentraler Bedeutung sind. Die Konformationen $c1_{LPD}$ und $c3_{LPD}$ beschreiben die Wirkung von $1,25(OH)_2D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$ -Agonisten. Es wurde gezeigt (4.4), daß Koaktivatoren den Rezeptor in der Konformation $c1_{LPD}$ und Korepressoren den Rezeptor in Konformation $c3_{LPD}$ bevorzugen. VDR-Moleküle in $c1_{LPD}$ haben eine kompakte LBD-Struktur, die an ihrem C-terminalen Ende nicht durch Trypsin verdaut werden kann. Die Konformation $c3_{LPD}$ scheint eine weiter geöffnete Struktur zu haben, da Trypsin in der Lage ist, den VDR nach der Aminosäure Arginin 391 zu verdauen.

Das „Mausefallen-Modell“ der Ligand-Bindung [26] suggeriert, daß $c1_{LPD}$ die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des Agonist-gebundenen VDR repräsentiert [52]. Hier ist H12 in Position („Falle“ oder „Deckel“ geschlossen) und der Rezeptor ist in der Lage, mit Koaktivatoren zu interagieren. Die Konformation $c1_{LPD}$ stellt die Ligand-sensitive (hoch-affine) VDR-Konformation dar [137; 138]. Analoge, die schon bei geringen Konzentrationen den Rezeptor in dieser Konformation stabilisieren können, sind deshalb potente Agonisten. Für manche Liganden konnte sogar gezeigt werden, daß die Anwesenheit eines Koaktivators die Ligand-Sensitivität für VDR-Moleküle in Konformation $c1_{LPD}$ deutlich erhöht [157]. Zusammenfassend deutet dies daraufhin, daß $c1_{LPD}$ für die agonistischen Aktionen verantwortlich ist und suggeriert, daß $c1_{LPD}$ die aktive (oder agonistische) Konformation des VDR darstellt.

Die Ergebnisse mit dem um die AF2-Domäne verkürztem VDR (**Abb. 28**) bestätigen, daß durch das Fehlen der AF2-Domäne der Rezeptor mit hoher Präferenz in Konformation $c3_{LPD}$ stabilisiert wird. Diese Konformation repräsentiert demnach die inaktive bzw. nicht-agonistische Konformation des Rezeptors. In diesem Zustand des VDR ist der „Deckel“ offen und H12 depositioniert. H12 wird dadurch zugänglich für Proteasen wie z.B. Trypsin. In dieser Konformation interagiert der Rezeptor mit Korepressoren. Analoge, die den Rezeptor in dieser Konformation stabilisieren, sind daher schwache Agonisten.

Das Modell der Ligand-induzierten Konformationen, welches die Daten zusammenfassend repräsentiert (**Abb. 37**), zeigt, daß sich die drei Konformationen des VDR sich nur in der Positionierung von H12 unterscheiden.

- Bei der Konformation $c3_{LPD}$ zeigt H12 von der LBD weg, der Rezeptor ist im inaktiven nicht agonistischen Zustand, eine Interaktion mit Korepressoren ist möglich.
- Konformation $c1_{LPD}$ ist der Zustand des Rezeptors, bei dem die für die Koaktivator-Interaktion wichtigen Aminosäuren der AF2-Domäne exponiert sind. Diese Konformation erlaubt die Interaktion mit Koaktivatoren, der Rezeptor ist transkriptionell aktiv.
- Konformation $c2_{LPD}$ repräsentiert die antagonistische Rezeptor-Konformation, die aufgrund einer Dispositionierung der AF2-Domäne keine Interaktion mit Koaktivatoren erlaubt. Der Rezeptor ist transkriptionell inaktiv.

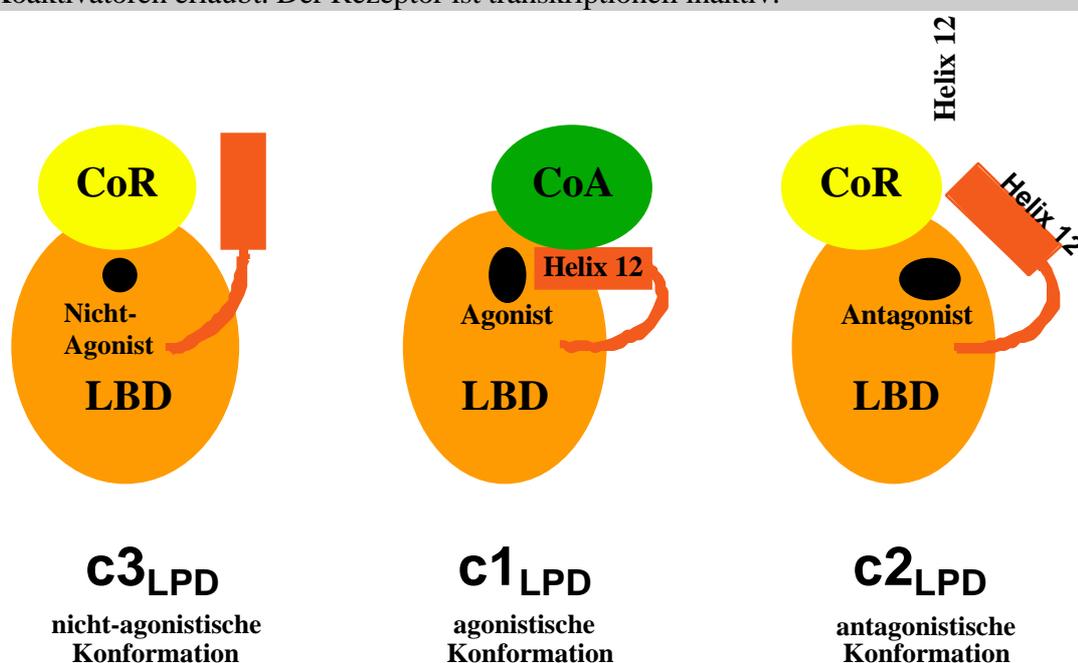


Abb. 37: Modell der Ligand-induzierten Konformationen des VDR. Die verschiedenen Konformationen des VDR unterscheiden sich nur in der Positionierung von H12 samt AF2-Domäne.

Das hier vorgestellte Modell stimmt mit dem gängigen Modell der Ligand-induzierten Genaktivierung dahingehend überein, daß der VDR nur mit Koaktivatoren interagieren kann, wenn er sich im aktiven agonist-gebundenen Zustand, d.h. in Konformation $c1_{LPD}$ befindet. Koaktivatoren können daher nicht selbst modulierend auf die Rezeptor-Konformationen wirken. Es erfolgt keine VDR-Koaktivator-Interaktion, bevor nicht die agonistische Rezeptor-Konformation $c1_{LPD}$ ausgebildet wurde.

In der Konformation $c1_{LPD}$ kann der VDR nicht mit Korepressoren interagieren. Für die Interaktion mit Korepressoren muß sich der Rezeptor im inaktiven, nicht-agonistischen Zustand, d.h. in Konformation $c3_{LPD}$, befinden. Die Gegenwart von NCoR bewirkt eine Abnahme der Ligand-Sensitivität und außerdem eine Zunahme der VDR-Moleküle im inaktiven, nicht-agonistischen Zustand. Am Beispiel von Gemini konnte sogar gezeigt werden, daß alle VDR-Moleküle in den inaktiven, nicht-agonistischen Zustand übergehen, wenn NCoR in hohen Konzentrationen vorliegt. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Menge an nicht-dissoziierten VDR-Korepressor-Komplexen von der Fähigkeit des Agonisten abhängt, den VDR im inaktiven Zustand zu stabilisieren.

Vergleicht man das Modell der Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen (**Abb. 37**) mit dem Kristallstrukturdaten (**Abb. 5**), so entspricht Konformation $c3_{LPD}$ der Konformation des apo-RAR, $c1_{LPD}$ der des holo-RAR und $c2_{LPD}$ der Konformation des Raloxifen-gebundenen ER. Der Vergleich des Modells mit den Daten der Kristallstrukturen verschiedener nukleärer Rezeptoren macht deutlich, daß es sich bei den Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen um ein generelles Prinzip handelt. Die Ligand-induzierte Konformation des nukleären Rezeptors hat für die Genexpression des Hormon-regulierten Gens weitreichende Konsequenzen. Die Modulation der Konformation ist demnach eine bedeutende Möglichkeit, die Expression eines Gens zu beeinflussen.

Sehr effektiv in der Modulation haben sich Kofaktoren und vor allem Korepressoren gezeigt. Möglicherweise können auf diese Weise zellspezifische Effekte verschiedener Agonisten erklärt werden. Das Verhältnis von Koaktivatoren zu Korepressoren ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich und könnte zell- oder gewebespezifische Effekte bedingen. Jeder Agonist wird eine bestimmte Menge der VDR-Moleküle in $c1_{LPD}$ oder $c3_{LPD}$ stabilisieren und damit im unterschiedlichen Maße eine Genaktivierung vermittelt. Demnach wird das zellspezifische Verhältnis der Kofaktoren zueinander auf die durch ein Analog vermittelte Genaktivität Einfluß haben. Diese Ergebnisse stellen somit auch die molekulare Basis für ein Verständnis eines selektiven Profils eines Analoges dar, welches kritisch für eine gewebespezifische therapeutische Anwendung ist.

4.6 Ausblick und Perspektiven

Ausgehend von der vorliegenden Arbeit ergeben sich Aspekte, die für zukünftige Forschungsprojekte von Interesse sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der VDR Ligand-unabhängig mit den Korepressoren NCoR und Alien interagieren kann. Es konnte auch gezeigt werden, daß die für diese Interaktion wichtigen Aminosäuren nicht in der H12 liegen. Der Nachweis von postulierten Aminosäure als Interaktionspunkte in H1 des VDR ergaben bislang keine konkreten Ergebnisse, obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Punktmutationen in diesem Bereich gemacht wurden. Dabei wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion die cDNA-Sequenz des VDR verändert. Bei dem daraus resultierten Protein sind dann gezielt einzelne Aminosäuren verändert. Die veränderten Proteine wurden im GST-*Pulldown* und im Luciferase-Reportergen *Assay* untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den VDR-Mutanten und dem VDR-Wildtyp nachgewiesen werden. Um den Interaktionsbereich genau zu charakterisieren müßten weitere Punktmutanten hergestellt und analysiert werden. Vor allem müßten auch Aminosäuren in den Helices 10 und 11 mit einbezogen werden, da postuliert wird, daß sich wichtige Aminosäuren für die VDR-Korepressor-Interaktion in diesen Helices befinden.

Bei der Überlegung, welche Aminosäuren für eine Interaktion mit Korepressoren von Bedeutung sein könnten, sind die Daten der Kristallstruktur des VDR [52] hilfreich. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß es sich um den holo-Rezeptor, also den Ligand-gebundenen Rezeptor handelt. Es wäre durchaus denkbar, und sogar im Sinne der Signalübertragung durch nukleäre Hormone, daß die für die Korepressor wichtigen Aminosäuren im Ligand-gebundenen Zustand nicht mehr zugänglich sind.

Interessant könnte auch sein, die modulierende Wirkung der Korepressoren auf andere Analoge zu untersuchen. Dabei sollte auf jedem Fall der Einfluß der Analoge auf die Histon-Deacetyltransferasen mit einbezogen werden.

Der postulierte Mechanismus der antagonistischen Wirkung von Analogen muß noch dahingehend genauer überprüft werden, ob es sich bei der Ligand-induzierten Blockade der VDR-Kofaktor-Interaktion um ein für alle VDR-Antagonisten gängiges Prinzip handelt. Die Daten des GR oder ER bestätigen das Model der Depositionierung der AF2-Domäne zwar, aber eine Kontrolle des Modells durch Untersuchungen an dem zweiten bislang beschriebenen VDR-Antagonisten TEI-9647 wären wichtig.

Die Superfamilie nukleärer Rezeptoren beinhaltet strukturell verwandte Proteine. Das Modell der Ligand-induzierten Konformationen könnte sich demnach auch auf andere nukleäre Rezeptoren übertragen lassen, obwohl es zunächst aus den Daten über den VDR entwickelt wurde. Der Vergleich des Modells mit den Kristallstrukturdaten (**Abb. 5**) läßt vermuten, daß es sich vielleicht um ein generelles Prinzip für die Regulation dieser Rezeptoren handelt.

Interessanterweise ergaben Untersuchungen am konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) bezüglich der Ligand-induzierten Rezeptor-Konformationen ein sehr ähnliches Modell [158]. Viele der *Orphan*-Rezeptoren sind von physiologischen Interesse, da sie ebenfalls therapeutisch interessante Zielgene haben. Ihre natürlichen Liganden sind jedoch meistens noch nicht bekannt. Eine Charakterisierung der funktionellen Konformationen, mit Hilfe synthetischer Liganden, würde die Suche nach potentiellen Liganden dieser Rezeptoren wesentlich erleichtern.

5. Zusammenfassung

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] ist ein nukleäres Hormon, welches endogen synthetisiert wird und aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft durch die Zell- und Kernmembran diffundieren kann. 1,25(OH)₂D₃ kommen regulatorische Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase, der Entwicklung der Knochen sowie Einfluß auf den Zellzyklus zu. Im Zellkern bindet 1,25(OH)₂D₃ an den als Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) bezeichneten nukleären Rezeptor. Der VDR gehört zu einer Superfamilie nukleärer Rezeptoren, zu denen auch die Steroidhormon-Rezeptoren und die *Orphan*-Rezeptoren gehören. Bei den nukleären Rezeptoren handelt es sich um strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren, die wie alle Transkriptionsfaktoren über eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Transaktivierungsfunktion (AF2-Domäne) verfügen. Mittels der beiden Zinkfinger in der DBD binden nukleäre Rezeptoren an Hormon-responsive Elemente (HRE) im Promotorbereich von Hormon-regulierten Genen. Desweiteren zeichnen sich nukleäre Rezeptoren aber auch durch eine Ligand-Bindedomäne (LBD) aus. Die Ligand-Bindung an den Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung der LBD und im Besonderen zu einer Konformationsänderung der AF2-Domäne. Diese Konformationsänderung ist für die Ligand-induzierte Aktivierung des nukleären Rezeptors verantwortlich. Dies ermöglicht eine Interaktion des Rezeptors mit Koaktivatoren. Koaktivatoren vermitteln den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie. Durch Histon-Acetylierung haben Koaktivatoren modulierenden Einfluß auf das Chromatin (Öffnung des Chromatins). Im nicht Ligand-gebundenen Zustand können nukleäre Rezeptoren repressorisch auf entsprechende Hormon-regulierte Gene wirken. Dies geschieht durch Interaktion des Rezeptors mit Korepressoren, die durch Histon-Deacetylierung ebenfalls modulierenden Einfluß auf die Chromatin-Struktur nehmen (Schließen des Chromatins).

Die Interaktionen mit den Kofaktoren stellt die Grundlagen der Genregulation durch nukleäre Rezeptoren dar. Liganden haben einen Einfluß auf die Konformation des VDR, und die Konformation des Rezeptors ist wichtig für die Kofaktor-Interaktion, so daß die Möglichkeit einer Ligand-abhängigen VDR-Kofaktor-Interaktion besteht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden:

- Der VDR verfügt über intrinsische repressorische Eigenschaften, die auf eine Interaktion des Rezeptors mit Korepressoren zurückzuführen sind. Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem VDR und den Korepressoren Alien und NCoR konnte nachgewiesen werden. Der Mechanismus der VDR vermittelten Repression von 1,25(OH)₂D₃-regulierten Genen verläuft dabei anscheinend über den etablierten Sin3-HDAC-Weg, d.h. Histon-Deacetyltransferasen und eine Kondensation des Chromatins

sind an der Repression des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Gens beteiligt. Bei steigenden Ligand-Konzentrationen dissoziiert der VDR-Korepressor-Komplex, d.h. die VDR-Korepressor-Interaktion ist Ligand-abhängig im Sinne einer Ligand-abhängig Genaktivierung.

- Eine Ligand- und AF2-Domänen-abhängige Interaktion des VDR mit Koaktivatoren der SRC-Familie konnte bestätigt werden. Die Interaktion des VDR mit Koaktivatoren erfolgt nur im Agonist-gebundenen Zustand des Rezeptors. Die Aminosäuren des VDR, die für die Interaktion wichtig sind, sind die Aminosäuren L417, E420 und F422.
- Die Komplex-Ausbildung des VDR-RXR-Heterodimers auf einem VDRE führt neben einer deutlichen Zunahme der Ligand-Sensitivität auch dazu, daß der Rezeptor präferenziell in der hoch-affinen Konformation $c1_{\text{LPD}}$ stabilisiert wird. Die auftretende Diskrepanz in der Potenz eines Analoges in DNA-unabhängigen und DNA-abhängigen *Assays* kann hierdurch erklärt werden. Für Korepressoren konnte gezeigt werden, daß sie einen deutlichen Einfluß auf die Ligand-Sensitivität und die stabilisierten Konformationen haben. Für Koaktivatoren konnte kein modulierender Einfluß festgestellt werden.
- Die Interaktion des VDR mit Kofaktoren kann durch geeignete Liganden moduliert werden. Dies konnte am Beispiel der Modell-Analoge Gemini und ZK159222 nachgewiesen werden. Gemini induziert nur sehr schwach eine Korepressor-Dissoziation des VDR, daher kann die von Gemini induzierte Genexpression durch hohe Mengen Korepressor reduziert werden. Die Bindung eines Antagonisten wie z.B. des Antagonisten ZK159222 an den VDR blockiert, durch Dispositionierung der AF2-Domäne, eine VDR-Koaktivator-Interaktion. Ligand- oder VDRE-vermittelte Kofaktor-Selektivitäten konnten nicht nachgewiesen werden.
- Den drei Rezeptor-Konformationen ($c1_{\text{LPD}}$, $c2_{\text{LPD}}$ und $c3_{\text{LPD}}$) konnte ihre funktionelle Bedeutung zugeordnet werden. Konformation $c3_{\text{LPD}}$ repräsentiert den inaktiven, bzw. nicht-agonistischen Zustand des Rezeptors. In dieser Konformation interagiert der Rezeptor mit Korepressoren und es kommt nicht zu einer Transkription des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Gens. Konformation $c1_{\text{LPD}}$ ist die agonistische, oder transkriptionell aktive Konformation des Rezeptors. In dieser Rezeptor-Konformation hat die AF2-Domäne eine Konformationsänderung durchgeführt, so daß der Rezeptor mit Koaktivatoren interagieren kann. Die selten vorkommende Konformation $c2_{\text{LPD}}$ ist die antagonistische Konformation des Rezeptors. Liganden, die den Rezeptor in dieser Form stabilisieren, blockieren eine Interaktion des Rezeptors mit Koaktivatoren, wodurch es wie bei Konformation $c3_{\text{LPD}}$, nicht zu einer Transkription des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Gens kommt.

6. Literaturverzeichnis

1. **Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P. J., Maler, B. A., Okret, S., Wikström, A.-C., Gustafsson, J.-A., and Yamamoto, K. R. (1986).** Genetic completion of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA, *Cell* 46, 389-399.
2. **Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., and Evans, R. M. (1987).** Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor, *Science* 237, 268-275.
3. **Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., and Chambon, P. (1986).** Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*, *Nature* 320, 134-139.
4. **Gronemeyer, H., Turcotte, B., Quirin-Stricker, C., Bocquel, M. T., Meyer, M. E., Krozowski, Z., Jeltsch, J. M., Lerouge, T., Garnier, J., and Chambon, P. (1987).** The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis, *EMBO J* 6, 3985-3994.
5. **Chang, C., Kokontis, J., and Liao, S. (1988).** Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7211-7215.
6. **Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennström, B. (1986).** The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone, *Nature* 324, 635-640.
7. **Thompson, C. C., Weinberger, C., Lebo, R., and Evans, R. M. (1987).** Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system, *Science* 237, 1610-1613.

8. **Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M., Crisp, T. M., Mangelsdorf, D. J., Haussler, M. R., Pike, J. W., Shine, J., and O'Malley, B. (1988).** Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D₃ receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3294-3298.
9. **Burmester, J. K., Wiese, R. J., Maeda, N., and DeLuca, H. F. (1988).** Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9499-9502.
10. **McDonnell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J. W., Haussler, M. R., and O'Malley, B. W. (1987).** Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D₃, *Science* 235, 1214-1217.
11. **Giguère, V., Ong, E. S., Segui, P., and Evans, R. M. (1987).** Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid, *Nature* 330, 624-629.
12. **Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., and Chambon, P. (1987).** A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors, *Nature* 330, 444-450.
13. **Evans, R. M. (1988).** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* 240, 889-895.
14. **Green, S., and Chambon, P. (1988).** Nuclear receptors enhance our understanding of transcriptional regulation, *Trends Genet* 4, 309-314.
15. **O'Malley, B. W. (1990).** The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future, *Mol Endocrinol* 4, 363-369.
16. **O'Malley, B. W., and Conneely, O. M. (1992).** Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation, *Mol Endocrinol* 6, 1359-1361.
17. **Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B.-Z., Hirschfeld, S., Appella, E., and Ozato, K. (1989).** H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8289-8293.

18. **Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1990).** Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway, *Nature* *345*, 224-229.
19. **Issemann, I., and Green, S. (1990).** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* *347*, 645-650.
20. **Milbrandt, J. (1988).** Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene, *Neuron* *1*, 183-188.
21. **Lazar, M., Hodin, R. A., Darling, D. S., and Chin, W. W. (1989).** A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA α* transcriptional unit, *Mol Cell Biol* *9*, 1128-1136.
22. **Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S.-i., Matsubara, K.-i., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1989).** Two *erbA* homologs encoding proteins with different T₃ binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus, *Cell* *57*, 31-39.
23. **Becker-André, M., André, E., and DeLamarter, J. F. (1993).** Identification of nuclear receptor mRNA by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences, *Biochem Biophys Res Commun* *194*, 1371-1379.
24. **Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamarter, J. F., and Becker-Andre, M. (1994).** RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers, *Mol Endocrinol* *8*, 757-70.
25. **Giguère, V. (1994).** Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling, *Endocr Rev* *15*, 61-79.
26. **Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998).** The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function, *Curr Opin Cell Biol* *10*, 384-91.
27. **Kliwer, S. A., Lehmann, J. M., and Willson, T. M. (1999).** Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse, *Science* *284*, 757-760.
28. **Freedman, L. P. (1992).** Anatomy of the steroid receptor zinc finger region, *Endocrine Rev* *13*, 129-145.

-
29. **Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994).** Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-*cis* retinoid acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element, *EMBO J* 13, 5370-5382.
30. **Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995).** How to finger DNA, *Nature* 375, 190-191.
31. **Klock, G., Strähle, U., and Schütz, G. (1987).** Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct, *Nature* 329, 734-736.
32. **Kerner, S. A., Scott, R. A., and Pike, J. W. (1989).** Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D₃, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4455-4459.
33. **Morrison, N. A., Shine, J., Fragonas, J.-C., Verkest, V., McMenemey, M. L., and Eisman, J. A. (1989).** 1,25-dihydroxyvitamin D₃-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene, *Science* 246, 1158-1161.
34. **Sap, J., Munoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H., and Vennström, B. (1989).** Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the *v-erb-A* oncogene product, *Nature* 340, 242-244.
35. **de Thé, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., and Dejean, A. (1990).** Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor gene, *Nature* 343, 177-180.
36. **Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., and Evans, R. M. (1991).** Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors, *Cell* 65, 1255-1266.
37. **Carlberg, C. (1999).** Lipid soluble vitamins in gene regulation, *Biofactors* 10, 91-7.
38. **Farwell, S. E., Lees, J. A., White, R., and Parker, M. G. (1990).** Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor, *Cell* 60, 953-962.

39. **Kumar, V. J., and Chambon, P. (1988).** The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer, *Cell* 55, 145-156.
40. **Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. I., Dahlman, K., Gustafsson, J. A., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1988).** Molecular interaction of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation, *Cell* 55, 361-369.
41. **Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991).** Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, *Nature* 352, 497-505.
42. **Bugge, T. H., Pohl, J., Lonnoy, O., and Stunnenberg, H. G. (1992).** RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors, *EMBO J* 11, 1409-1418.
43. **Kliwer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1992).** Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling, *Nature* 355, 446-9.
44. **Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Näär, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J.-M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1991).** RXR α : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D₃ receptors to their cognate response elements, *Cell* 67, 1251-1266.
45. **Yu, X.-P., Hustmeyer, F. G., Garvey, W. T., and Manolagas, S. C. (1991).** Demonstration of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃-responsive protein in human lymphocytes: immunologic crossreactivity and inverse regulation with the vitamin D₃ receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8347-8351.
46. **Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995).** Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RXR α , *Nature* 375, 377-382.
47. **Renaud, J.-P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995).** Crystal structure of the RAR α ligand-binding domain bound to all-*trans* retinoic acid, *Nature* 378, 681-689.

-
48. **Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D., and Fletterick, R. J. (1995).** A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor, *Nature* *378*, 690-697.
49. **Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J.-A., and Carlquist, M. (1997).** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* *389*, 753-758.
50. **Milburn, M. V., Charifson, P., Lambert, M., Cobb, J. and Wisely, G.B., (1997).** Ligand binding and activation of PPAR, EMBO Workshop.
51. **Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998).** Atomic structure of progesterone complexed with its receptor, *Nature* *393*, 392-396.
52. **Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B., and Moras, D. (2000).** Crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D₃ bound to its natural ligand, *Mol Cell* *5*, 173-179.
53. **Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M. G. (1998).** Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses, *Curr Opin Cell Biol* *10*, 373-383.
54. **Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995).** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science* *270*, 1354-1357.
55. **Henttu, P. M. A., Kalkhoven, E., and Parker, M. G. (1997).** AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors, *Mol Cell Biol* *17*, 1832-1839.
56. **Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996).** TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, *EMBO J* *15*, 3667-3675.

- 57. Le Dourain, B., Zechel, C., Garnier, J.-M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, H., Chambon, P., and Losson, R. (1995).** The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18, *EMBO J* *14*, 2020-2033.
- 58. Cavailles, V., Dauvois, S., L`Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J., and Parker, M. G. (1995).** Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor, *EMBO J* *14*, 3741-3751.
- 59. Yeh, S., and Chang, C. (1996).** Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells, *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 5517-5521.
- 60. Chen, H., Lin, R. J., Svhlitz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997).** Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with p/CAF and CBP/p300, *Cell* *90*, 569-580.
- 61. Halachimi, S., Marden, E., Martin, G., Mackay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994).** Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription, *Science* *264*, 1455-1458.
- 62. Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L., and Stallcup, M. R. (1996).** GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors, *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 4948-4952.
- 63. Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997).** The transcriptional co-activator p/CIP binds and mediates nuclear-receptor function, *Nature* *387*, 677-684.
- 64. Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X.-Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.-P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997).** AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer, *Science* *277*, 965-968.

-
- 65. Chen, J. D., and Li, H. (1998).** Coactivation and corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 169-190.
- 66. Li, H., Gomes, P. J., and Chen, J. D. (1997).** RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8479-8484.
- 67. Herry, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997).** A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors, *Nature* 387, 733-736.
- 68. McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T.-M., Kronen, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998).** Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation, *Genes & Dev* 12, 3357-3368.
- 69. Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998).** The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways, *EMBO J* 17, 507-519.
- 70. Yao, T.-P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D. M. (1996).** The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10626-10631.
- 71. Nolte, R. T., Wisley, G. B., westin, S., Cobb, J. E., Lambert, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., and Milburn, M. V. (1998).** Ligand-binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- , *Nature* 395, 137-143.
- 72. McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1999).** Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions, *J Steroid Biochem Molec Biol* 69, 3-12.
- 73. Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999).** Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Curr Opin Genet Develop* 9, 140-147.

-
- 74. Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000).** The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes & Dev* *14*, 121-141.
- 75. Freedman, L. P. (1999).** Multimeric coactivator complexes for steroid/nuclear receptors, *Trends Endocrinol Metab* *10*, 403-407.
- 76. Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1997).** Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase, *Nature* *389*, 194-198.
- 77. Yang, X.-J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J.-i., Howard, B., and Nakatani, Y. (1996).** A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein *el1a*, *Nature* *382*, 319-324.
- 78. Luo, R. X., and Dean, D. C. (1999).** Chromatin remodeling and transcriptional regulation, *J Natl Can Inst* *91*, 1288-1294.
- 79. Starr, D. B., Matsui, W., Thomas, J. R., and Yamamoto, K. R. (1996).** Intracellular receptors use a common mechanism to interpret signaling information at response elements, *Genes & Dev* *10*, 1271-1283.
- 80. Hörlein, A. J., Näär, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1995).** Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor, *Nature* *377*, 397-404.
- 81. Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995).** A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors, *Nature* *377*, 454-457.
- 82. Seol, W., Mahon, M. J., Lee, Y.-K., and Moore, D. D. (1996).** Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/NCoR, *Mol Endocrinol* *10*, 1646-1655.
- 83. Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Lazar, M. A. (1997).** Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 14400-14405.

84. Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R., and Baniahmad, A. (1999). Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily, *Mol Cell Biol* 19, 3383-3394.
85. Zamir, I., Harding, H. P., Atkins, G. B., Hörlein, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Lazar, M. A. (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains, *Mol Cell Biol* 16, 5458-5465.
86. Nagy, L., Kao, H.-Y., Love, J. D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J. T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R. M., and J.W.R., S. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, *Genes & Dev* 13, 3209-3216.
87. Hu, X., and Lazar, M. A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors, *Nature* 402, 93-96.
88. Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Kronen, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction, *Genes & Dev* 13, 3198-3208.
89. Sheridan, P. L., Mayan, T.P., Verdin, e. and Jones, K.A. (1997). Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro, *Genes & Dev* 11, 3327-3340.
90. Huang, E. Y., Zhang, J., Miska, E. A., Guenther, M. G., Kouzarides, T., and Lazar, M. A. (2000). Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway, *Genes & Dev* 14, 45-54.
91. Kao, H.-Y., Downes, M., Ordentlich, P., and Evans, R. M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression, *Genes & Dev* 14, 55-66.
92. Heinzl, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T.-M., Söderström, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). A complex containing N-CoR, a mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature* 378, 43-48.

93. **Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997).** Nuclear receptor repression mediated by a complex containing smrt, mSin3a, and histone deacetylase, *Cell* 89, 373-380.
94. **Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997).** Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression, *Nature* 378, 49-55.
95. **Rowan, B. G., Weigel, N. L., and O'Malley, B. W. (2000).** Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1: identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem* 275, 4475-4483.
96. **Walters, M. R. (1992).** Newly identified actions of the vitamin D₃ endocrine system, *Endocr Rev* 13, 719-764.
97. **Reichel, H., and Norman, A. W. (1989).** Systemic effects of vitamin D₃, *Ann Rev Med* 40, 71-78.
98. **Carlberg, C., and Polly, P. (1998).** Gene regulation by vitamin D₃, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 19-42.
99. **Vieth, R. (1990).** The mechanisms of vitamin d toxicity, *Bone Mineral* 11, 267-272.
100. **Takeyama, K.-i., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J., and Kato, S. (1997).** 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D₃ synthesis, *Science* 277, 1827-1830.
101. **Li, Y. C., Pirro, A. E., Amling, M., Delling, B., R., Bronson, R., and Demay, M. B. (1997).** Targeted ablation of the vitamin d receptor: an animal model of vitamin D₃-dependent rickets type II with alopecia, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9831-9835.
102. **Szipirer, S., Szipirer, C., Riviere, M., Levan, G., Maryen, P., Cassiman, J. J., Wiese, R., and DeLuca, H. F. (1991).** The SP1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosomal arm 12q and rat chromosome 7, *Genomics* 11, 168-173.

-
- 103. Darwish, H. M., and DeLuca, H. F. (1996).** Analysis of binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor to positive and negative vitamin D response elements, *Archives of Biochemistry and Biophysics* *334*, 223-234.
- 104. Giguère, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. (1994).** Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR γ , a novel family of orphan hormone nuclear receptors, *Genes & Dev* *8*, 538-553.
- 105. Lazar, M. A. (1993).** Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities, *Endocrine Rev* *14*, 184-193.
- 106. Gross, C., Musiol, I. M., Eccleshall, T. R., Malloy, P. J., and Feldman, D. (1998).** Vitamin D₃ receptor gene polymorphism: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun* *242*, 467-473.
- 107. Carlberg, C. (1995).** Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃ interplay with retinoid and thyroid hormone signalling, *Eur J Biochem* *231*, 517-27.
- 108. Rhodes, S. J., Chen, R., DiMattia, G. E., Scully, K. M., Kalla, K. A., Lin, S.-C., Yu, V. C., and Rosenfeld, M. G. (1993).** A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the *pit-1* gene, *Genes & Dev* *7*, 913-932.
- 109. Gill, R. K., and Christakos, S. (1993).** Identification of sequence elements in mouse calbindin-d_{28k} gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D₃- and butyrate-inducible responses, *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 2984-2988.
- 110. Kahlen, J. P., and Carlberg, C. (1994).** Identification of a vitamin d receptor homodimer-type response element in the rat calcitriol 24-hydroxylase gene promoter, *Biochem Biophys Res Commun* *202*, 1366-72.
- 111. Schule, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Bolado, J., Pike, J. W., and Evans, R. M. (1990).** Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene, *Cell* *61*, 497-504.

- 112. Polly, P., Carlberg, C., Eisman, J. A., and Morrison, N. A. (1996).** Identification of a vitamin D₃ response element in the fibronectin gene that is bound by a vitamin D₃ receptor homodimer, *J Cell Biochem* 60, 322-33.
- 113. Schröder, M., Kahlen, J. P., and Carlberg, C. (1997).** Functional characterization of a novel type of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ response element identified in the mouse *c-fos* promoter, *Biochem Biophys Res Commun* 230, 646-51.
- 114. Schröder, M., Nayeri, S., Kahlen, J. P., Muller, K. M., and Carlberg, C. (1995).** Natural vitamin D₃ response elements formed by inverted palindromes: polarity-directed ligand sensitivity of vitamin D₃ receptor-retinoid X receptor heterodimer-mediated transactivation, *Mol Cell Biol* 15, 1154-61.
- 115. Schröder, M., Muller, K. M., and Carlberg, C. (1994).** Specificity and flexibility of vitamin D signaling. Modulation of the activation of natural vitamin D response elements by thyroid hormone, *J Biol Chem* 269, 5501-4.
- 116. Schröder, M., Müller, K. M., Becker-André, M., and Carlberg, C. (1994).** Response element selectivity for heterodimerization of vitamin D receptors with retinoic acid and retinoid X receptors, *J Mol Endocrinol* 12, 327-339.
- 117. Carlberg, C. (1996).** The vitamin D₃ receptor in the context of the nuclear receptor superfamily: the central role of retinoid X receptor, *Endocrine* 4, 91-105.
- 118. Norman, A. W., Adams, D., Collins, E. D., Okamura, W. H., and Fletterick, R. J. (1999).** Three-dimensional model of the ligand binding domain of the nuclear receptor for 1,25-dihydroxy-vitamin D₃, *J Cell Biochem* 74, 323-333.
- 119. Ettinger, R. A., and DeLuca, H. F. (1996).** The vitamin D endocrine system and its therapeutic potential, *Advances in Drug Research* 28, 269-312.
- 120. Binderup, L., and Kragballe, K. (1992).** Origin of the use of calcipotriol in psoriasis treatment, *Rev Contemp Pharmacother* 3, 357-365.
- 121. Mørk Hansen, C., and Mäenpää, P. H. (1997).** EB1089 - a novel vitamin D analog with strong antiproliferative and differentiation inducing effects on target cells, *Biochem Pharmacol* 54, 1173-1179.

- 122. Gulliford, T., English, J., Colston, K. W., Menday, P., Moller, S., and Coombes, R. C. (1998).** A phase I study of the vitamin D analogue EB1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer, *Br J Cancer* 78, 6-13.
- 123. Takeyama, K.-I., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., and Kato, S. (1999).** Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog, *Mol Cell Biol* 19, 1049-1055.
- 124. Leng, X., Tsai, S., O'Malley, B. W., and Tsai, M.-J. (1993).** Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoid X receptor, *J Steroid Biochem Molec Biol* 46, 643-661.
- 125. Miura, D., Manabe, K., Gao, Q., Norman, A. W., and Ishizuka, S. (1999).** 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone analogues antagonize differentiation of human leukemia cells (HL-60 cells) but not of human acute promyelocytic leukemia cells (NB4 cells), *FEBS Lett* 460, 297-302.
- 126. Miura, D., Manabe, K., Ozono, K., Saito, M., Gao, Q., Norman, A. W., and Ishizuka, S. (1999).** Antagonistic action of novel 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone analogs on differentiation of human leukemia cells (HL-60) induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, *J Biol Chem* 274, 16392-16399.
- 127. Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1998).** Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene, *Science* 279, 1922-1925.
- 128. Nayeri, S., and Carlberg, C. (1997).** Functional conformations of the nuclear 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor, *Biochem J* 327, 561-8.
- 129. Gill, R. K., Atkins, L. M., Hollis, B. W., and Bell, N. H. (1998).** Mapping the domains of the interaction of the vitamin D receptor and steroid receptor coactivator-1, *Mol Endocrinol* 12, 57-65.
- 130. Li, H., and Chen, J. D. (1998).** The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation, *J Biol Chem* 273, 5948-5954.

131. **Kahlen, J. P., and Carlberg, C. (1996).** Functional characterization of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor binding site found in the rat atrial natriuretic factor promoter, *Biochem Biophys Res Commun* 218, 882-6.
132. **Guo, B., Aslam, F., van Wijnen, A. J., Robertis, S. G. E., Frenkel, B., Green, M. R., DeLuca, H., Lian, J. B., Stein, G. S., and Stein, J. L. (1997).** YY1 regulates vitamin D receptor/retinoid X receptor mediated transactivation of the vitamin D responsive osteocalcin gene, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 121-126.
133. **Alroy, I., Towers, T. L., and Freedman, L. P. (1995).** Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition of NFAT_p/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor, *Mol Cell Biol* 15, 5789-5799.
134. **Matkovits, T., and Christakos, S. (1995).** Ligand occupancy is not required for vitamin D receptor and retinoid receptor-mediated transcriptional activation, *Mol Endocrinol* 9, 232-242.
135. **Sanger F, N. S., Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors., *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
136. **Polly, P., Herdick, M., Moehren, U., Baniahmad, A., Heinzl, T., and Carlberg, C. (2000).** VDR-alien: A novel, DNA-selective vitamin D₃ receptor-corepressor partnership, *FASEB J* 14, 1455-1463.
137. **Quack, M., Clarin, A., Binderup, E., Björkling, F., Mørk Hansen, C., and Carlberg, C. (1998).** Structural variants of the vitamin D analogue EB1089 reduce its ligand sensitivity and promoter selectivity, *J Cell Biochem* 71, 340-50.
138. **Quack, M., Mork Hansen, C., Binderup, E., Kissmeyer, A. M., and Carlberg, C. (1998).** Metabolism of the vitamin D₃ analogue EB1089 alters receptor complex formation and reduces promoter selectivity, *Br J Pharmacol* 125, 607-14.
139. **Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L. J., Grippo, J. F., and Hunziker, W. (1993).** Two nuclear signalling pathways for vitamin D, *Nature* 361, 657-60.
140. **Ozono, K., Liao, J., Kerner, S. A., Scott, R. A., and Pike, J. W. (1990).** The vitamin D-responsive element in the human osteocalcin gene. Association with a nuclear proto-oncogene enhancer, *J Biol Chem* 265, 21881-21888.

141. **Kurokawa, R., Söderström, M., Hörlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1995).** Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor, *Nature* 377, 451-454.
142. **Kraichely, D. M., Collins, J. J., DeLisle, R. K., and MacDonald, P. N. (1999).** The autonomous transactivation domain in helix H3 of the vitamin d receptor is required for transactivation and coactivator interaction, *J Biol Chem* 274, 14352-14358.
143. **Jimenez-Lara, A. M., and Aranda, A. (1999).** Lysine 246 of the vitamin D receptor is crucial for ligand-dependent interaction with coactivators and transcriptional activity, *J Biol Chem* 274, 13503-13510.
144. **Leers, J., Treuter, E., and Gustafsson, J.-A. (1998).** Mechanistic principles in NR box-dependent interaction between nuclear hormone receptors and the coactivator TIF2, *Mol Cell Biol* 18, 6001-6013.
145. **Herdick, M., Bury, Y., Quack, M., Uskokovic, M., Polly, P., and Carlberg, C. (2000).** Response element- and coactivator-mediated conformational change of the vitamin D₃ receptor permits sensitive interaction with agonists., *Mol Pharmacol* 57, 1206-1217.
146. **Näär, A. M., Beaurang, P. A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., and Tjian, R. (1999).** Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation, *Nature* 398, 828-832.
147. **Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Näär, A. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1999).** Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex, *Nature* 398, 824-828.
148. **Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.-P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L. P. (1998).** A novel protein complex that interacts with the vitamin D₃ receptor in a ligand-dependent manner and enhances transactivation in a cell-free system, *Genes & Dev* 12, 1787-1800.
149. **Fondell, J. D., Ge, H., and Roeder, R. G. (1996).** Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8329-8333.

- 150. Chiba, N., Suldan, Z., Freedman, L. P., and Parvin, J. D. (2000).** Binding of liganded vitamin D receptor to the vitamin D receptor interacting protein coactivator complex induces interaction with RNA polymerase II holoenzyme, *J Biol Chem* 275, 10719-10722.
- 151. Rachez, C., Gamble, M., Chang, C.-P. B., Atkins, G. B., Lazar, M. A., and Freedman, L. P. (2000).** The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitutive functionally distinct complexes, *Mol Cell Biol* 20, 2718-2726.
- 152. Nayeri, S., Kahlen, J. P., and Carlberg, C. (1996).** The high affinity ligand binding conformation of the nuclear 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor is functionally linked to the transactivation domain 2 (AF-2), *Nucleic Acids Res* 24, 4513-8.
- 153. Bury, Y., Steinmeyer, A. and Carlberg, C. (2000).** Structure activity relationship of carboxylic esters antagonists of the vitamin D₃ receptor, *Mol Pharmacol*, in press.
- 154. Herdick, M., Steinmeyer, A., and Carlberg, C. (2000).** Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is mediated by a lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators, *J Biol Chem* 275, in press.
- 155. Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. (1998).** The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen, *Cell* 95, 927-937.
- 156. Ozono, K., Saito, M., Miura, D., Michigami, T., Nakajima, S., and Ishizuka, S. (1999).** Analysis of the molecular mechanism for the antagonistic action of a novel 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogue toward vitamin D receptor function, *J Biol Chem* 274, 32376-32381.
- 157. Herdick, M. and Carlberg, C. (2000).** Agonist-triggered modulation of the activated and silent state of the vitamin D₃ receptor by interaction with corepressors and coactivators, submitted.

- 158. Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S. G., Willson, T. M., Collins, J. L., and Kliewer, S. A. (2000).** Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands, *J Biol Chem* 275, 15122-15127.

7. Liste der Abbildungen und Tabellen:

	Seite
Abbildungen:	
Abb. 1:	Signalübertragung durch nukleäre Rezeptoren 2
Abb. 2:	Der modulare Aufbau nukleärer Rezeptoren 4
Abb. 3:	Überblick über den Aufbau von HREs 5
Abb. 4:	Dimerisierungstypen nukleärer Rezeptoren auf verschiedenen HREs 6
Abb. 5:	Kristallstruktur der LBDs verschiedener nukleärer Rezeptoren 7
Abb. 6:	Proteinaufbau der Koaktivatoren der SRC-Familie 9
Abb. 7:	Kristallstruktur der LBD des PPAR und die Lage des Kofaktors zur H12 10
Abb. 8:	Aufbau der Korepressoren 12
Abb. 9:	Syntheseweg von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 14
Abb. 10:	VDR-RXR-Heterodimere auf DR3-Typ und IP9-Typ VDREs 16
Abb. 11:	Strukturen der verwendeten Analoge 24
Abb. 12:	Konstrukte für den <i>Mammalian-One-Hybrid-Assay</i> 27
Abb. 13:	Konstrukte für den Luciferase-Reporter- <i>Assay</i> 28
Abb. 14:	VDR vermittelte Repression 54
Abb. 15:	VDR-Korepressor Interaktion <i>in vitro</i> 55
Abb. 16:	Ligand-induzierte VDR-Korepressor Dissoziation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> 57
Abb. 17:	Bedeutung der AF2-Domäne für die VDR-Korepressor-Interaktion 58
Abb. 18:	Funktionelle Ligand-abhängige Genaktivierung im <i>Mammalian-One-Hybrid-System</i> 60
Abb. 19:	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelt eine VDR-Kofaktor-Interaktion 61
Abb. 20:	Ligand-induzierter <i>Supershift</i> von DNA-gebundenen VDR-RXR-Heterodimeren 62
Abb. 21:	Die AF2-Domäne ist für die Koaktivator-Interaktion notwendig 64
Abb. 22:	TIF2 modulierte funktionelle Aktivität 66
Abb. 23:	Ligand-abhängige VDR-Koaktivator-Interaktion 67
Abb. 24:	Ligand-induzierter VDR-RXR-VDRE <i>Supershift</i> mit TIF2 68
Abb. 25:	Einfluß verschiedener Parameter auf die funktionellen Konformationen des VDR 70
Abb.: 26:	Limitierter Proteaseverdau des VDR _{wt} und VDR _{Mutanten} 71
Abb. 27:	Die AF2-Domäne ist für die Koaktivator-Interaktion notwendig 74
Abb. 28:	Ligand-abhängige Modulation der Korepressor-Dissoziation 76
Abb. 29:	Modulation der Ligand-vermittelten funktionellen Aktivität durch NCoR 77
Abb. 30:	ZK159222 stabilisierte Rezeptor-Konformationen 78
Abb. 31:	ZK159222 stimuliert keine VDR-Koaktivator-Interaktion 79
Abb. 32:	Funktionelle Charakterisierung von ZK159222 im <i>Mammalian-One-Hybrid-System</i> 80
Abb. 33:	Dosis-Abhängigkeit des antagonistischen Effektes von ZK159222 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> 82
Abb. 34:	Modell der Repression von Hormon-regulierter Gene 84
Abb. 35:	Modell der Ligand-induzierten Aktivierung des Transkription von Hormon-regulierten Genen - erster Schritt 87
Abb. 36:	Modell der Ligand-induzierten Aktivierung des Transkription von Hormon-regulierten Genen - zweiter Schritt 88
Abb. 37:	Modell der Ligand-induzierten Konformationen des VDR 95
Tabellen:	
Tab. 1:	Expressionsvektoren 25
Tab. 2:	Primerkombinationen 25
Tab. 3:	DNA-Konstrukte 26
Tab. 4:	Primer 27
Tab. 5:	Aufbau der VDREs 28
Tab. 6:	Inkubations-Parameter 46
Tab. 7:	Kulturbedingungen 49
Tab. 8:	Transfektions-Ansätze der beiden Reporter- <i>Assays</i> 51
Tab. 9:	Pipettierschema der Reporter- <i>Assays</i> 51
Tab. 10:	Zusammenstellung der Ergebnisse der verschieden Typen an LPD- <i>Assays</i> für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Gemini 73

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei allen bedanken, die auf die eine oder andere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ohne daß ich alle persönlich nennen kann.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Carsten Carlberg für seine Betreuung, die vielen hilfreichen Diskussionen und vor allem dafür, daß er es ermöglicht hat, daß unsere Arbeitsgruppe den elften Vitamin D₃-Kongreß in Nashville, Tennessee, USA besuchen konnte.

Herrn Prof. Hollenberg möchte ich dafür danken, daß er sich bereit erklärt hat das Zweitgutachten zu erstellen.

Meinen herzlichsten Dank gilt meiner Arbeitsgruppe, für die schöne Zeit und den Spaß den wir hatten sowie meinem Mann Andreas und meiner gesamten Familie für die liebevolle Unterstützung.

Lieben Dank auch Andrea Windhövel fürs Korrekturlesen.

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwendet. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den 9.9.00