

1 Einleitung

1.1 Prostatakrebstherapie: Ein Einblick in die Geschichte

1853 wurde erstmals von dem Chirurgen J. Adams in einem Londoner Krankenhaus Prostatakrebs durch eine histologische Untersuchung diagnostiziert [1]. Adams notierte in seinem Bericht, dass dies eine sehr seltene Krankheit sei. Bemerkenswerterweise ist Prostatakrebs 160 Jahre später die am häufigsten diagnostizierte Krebsart und nach Lungenkrebs die zweithäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle bei Männern in Europa [2]. Der dramatische Anstieg der Prostatakrebsfälle hat verschiedene Ursachen. Zum einen konnte Prostatakrebs bis in den frühen 1900ern nicht von anderen Erkrankungen des Urogenitaltrakts unterschieden werden. Zum anderen hat sich die Anzahl der Prostatakrebsneuerkrankungen aufgrund der gestiegenen durchschnittlichen Lebenserwartung erhöht [3]. Darüber hinaus scheint dies mit der „westlichen“ Lebensweise in Verbindung zu stehen [4].

Das Konzept der Prostatakrebstherapie geht auf das Jahr 1786 zurück, als John Hunter in Tieren eine Verkleinerung der Prostata nach Kastration beobachtete [5]. Circa 150 Jahre später fand Charles Huggins heraus, dass neben einer Kastration die Verabreichung des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES) zu einer Verkleinerung der Prostata führen. Diese konnte er durch die Gabe von Androgenen rückgängig machen, was zeigte, dass das Wachstum der Prostata von Androgenen beeinflusst wird. 1941 veröffentlichten Charles Huggins und Clarence Hodges, dass der Entzug von Androgenen durch Kastration oder die Verabreichung von DES einen negativen Einfluss auf die Bildung von Metastasen in Prostatakrebs hat [6]. Dies war der Beginn einer neuen Ära der Prostatakrebstherapie, in der systemisch mit einer chirurgischen oder chemischen Kastration (durch DES) vorgegangen wurde. Als Anerkennung für seine Pionierarbeit erhielt Huggins 1966 einen Nobelpreis in Physiologie und Medizin. Die chirurgische Kastration und DES waren für mehr als 40 Jahre die initiale Standardbehandlung für fortgeschrittene Prostatakrebsstadien. Nach der Entdeckung der Struktur von LHRH (luteinisierendes Hormon *releasing*-Hormon) 1971 durch Schally und Mitarbeiter [7], wurden erstmals Prostatakrebspatienten mit LHRH-Agonisten behandelt, die das Serum Androgenlevel reduzieren [8]. LHRH hat gegenüber DES den Vorteil keine estrogenen Nebenwirkungen mit sich zu bringen.

Seitdem in den späten 1960er Jahren mehr und mehr über den Mechanismus der Androgenwirkung verstanden wurde, entwickelten Forscher Antiandrogene, wie

Cyproteronazetat [9], Flutamid [10], oder Bicalutamid [11], die gezielt Androgenen entgegenwirken. 1982 wurden erste Patienten mit fortgeschrittenen Prostatakrebstadien mit einer Kombination aus LHRH-Agonist und Antiandrogen behandelt, um eine maximale Androgenblockade zu erreichen [12]. Die Behandlung von Prostatakrebs ist in vielen Fällen zunächst erfolgreich, häufig kommt es jedoch zur Entwicklung eines androgenunabhängigen Phänotyps, dem sogenannten „kastationsresistenten“ Prostatakrebs, welcher gegenüber der initialen Hormontherapie resistent ist. Diese Form des Karzinoms wird standardmäßig mit Docetaxel chemotherapeutisch behandelt, was das Leben der Patienten um einige Monate verlängert [13, 14].

1.2 Der Androgenrezeptor

1.2.1 Mechanismus der Androgenrezeptor-Aktivierung

Androgene sind Cholesterolderivate aus 19 Kohlenstoffatomen, die in Testes, Ovarien und Nebennieren gebildet werden. In Männern sind Androgene für die Bildung und den Erhalt sekundärer Geschlechtsmerkmale, sowie für die reproduktive Funktion wichtig. Darüber hinaus erhalten Androgene die Struktur und Funktion der Prostata [15]. Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) sind die am häufigsten vorkommenden Androgene. Testosteron zirkuliert im Blut an *carrier*-Proteine gebunden [16-18]. Nach Diffusion in die Zielzelle [19] wird Testosteron in seinen Metaboliten DHT umgewandelt. DHT wird im männlichen Urogenitaltrakt und anderen peripheren Geweben von zwei 5 α -Reduktasen gebildet [20]. 5 α -Reduktase Typ 1 wird in Talgdrüsen und Leber und 5 α -Reduktase Typ 2 im männlichen Urogenitaltrakt exprimiert.

Die Wirkung von Androgenen ist vom Androgenrezeptor (AR), der der Familie der Steroidhormonrezeptoren angehört, abhängig. Das Konzept der Steroidhormonrezeptoren wurde in den 1960er Jahren etabliert und der AR wurde als Protein, welches eine hohe Affinität und Spezifität für Androgene hat, identifiziert [21]. Das AR-Gen wurde erstmals 1988 kloniert [22-24].

Der AR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der sich inaktiv im Zytoplasma der Zelle in einem Komplex mit molekularen Chaperonen, die die Stabilität des Rezeptors und den Erhalt seiner Konformation gewähren, befindet. Zu den molekularen Chaperonen zählen Hitzeschockproteine (Hsp), wie Hsp70, Hsp90 und

Immunophilinen [25-27]. Nach Ligandenbindung dissoziiert der AR vom Chaperonkomplex, es kommt zu Konformationsänderungen und zur Phosphorylierung des AR [28, 29]. Dies induziert den Transport des AR in den Zellkern, wo er als Homodimer im Bereich spezifischer androgenresponsiver Elemente (AREs) an DNA bindet. An Chromatin interagiert der Rezeptor mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie [30] und Korregulatoren [31], die die Genexpression regulieren. Unter anderem reguliert der AR Gene, die das Zellwachstum fördern [25, 32].

1.2.2 Domänen des Androgenrezeptors

Der AR ist ein 919 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 110 kDa [33]. Er zählt als Steroidhormonrezeptor zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Strukturell ist der AR mit Typ1 Rezeptoren, wie Mineralocorticoid-, Glucocorticoid-, Progesteron- und Estrogenrezeptor verwandt, die nach Ligandenbindung Homodimere bilden [34]. Wie alle Steroidhormonrezeptoren, besitzt der AR vier funktionelle Domänen [35]. Er weist eine N-terminale transaktivierende Domäne (TAD), eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne (DBD), an die die Hinge-Region angrenzt, die das Kernlokalisierungssignal (NLS, nukleäres Lokalisierungssignal) beinhaltet [36, 37] und eine C-terminale Ligandenbindedomäne (LBD) auf (Abbildung 1).

Die TAD enthält eine für Steroidhormonrezeptoren charakteristische *activation function 1* (AF1) Domäne, die im AR aus zwei voneinander unabhängigen Bereichen, $\tau 1$ (Aminosäuren 100-360) und $\tau 5$ (Aminosäuren 360-528), besteht [38]. Diese übernehmen eine Funktion in der ligandenabhängigen bzw. -unabhängigen Transaktivierung [39].

Die in Steroidhormonrezeptoren hoch konservierte DBD besteht aus zwei Zinkfingern, die für die Erkennung von androgenresponsiven Elementen (AREs) wichtig sind [40]. Die Spezifität der DNA-Bindung wird über die sogenannte P-Box, einem Bereich aus fünf Aminosäuren im ersten Zinkfinger, reguliert. Diese bindet an die große Furche der DNA und ist für die Sequenzerkennung und DNA-Bindung wichtig [41]. Im zweiten Zinkfinger liegt die D-Box, welche ebenfalls aus fünf Aminosäuren besteht. Sie ist in die DNA-abhängige Dimerisierung der Rezeptormonomere involviert [41, 42]. Neben diesen Motiven sind weitere Bereiche in die DNA-Bindung und Dimerisierung des

AR einbegriffen [43, 44]. Vor allem Bereiche in der Hinge-Region (Aminosäuren 625 bis 636) stellen eine zusätzliche Oberfläche für die Dimerisierung dar, die im Zusammenspiel mit dem zweiten Zinkfinger die Spezifität und Affinität der DNA-Bindung regulieren [44-46].

Die Hinge-Region ist eine nicht konservierte flexible Region, die DBD und LBD voneinander trennt. Sie ist eine multifunktionale Domäne, die in die DNA-Bindung [45, 47-49] und Translokalisierung in den Nukleus [36] involviert ist. Studien haben gezeigt, dass 12 Aminosäurereste (⁶²⁵TLGARKLKKLGN⁶³⁶) für eine optimale DNA-Bindung benötigt werden [45, 47-49]. Die hormonabhängige Translokalisierung geht hauptsächlich von einem zweiteiligen Kernlokalisationsignal aus, welches aus zwei *clustern* basischer Aminosäuren besteht, die in DBD und Hinge-Region lokalisiert sind [36]. Darüber hinaus besitzt der AR Acetylierungsstellen im Bereich der Hinge-Region [50], welche die transkriptionelle Aktivität [50, 51], subzelluläre Lokalisierung und Faltung des AR [52], sowie die Bindung von Korregulatoren [51-53] regulieren.

Die Ligandenbindedomäne ist für die Bindung des Liganden und die Interaktion mit Hitzeschockproteinen und Koaktivatoren wichtig. Die Transaktivierung der meisten nukleären Hormonrezeptoren erfolgt durch eine Region in der LBD, genannt *activation function 2* (AF2) Domäne. Diese ermöglicht die ligandenabhängige transkriptionelle Aktivität [54, 55]. Im Gegensatz zu anderen nukleären Hormonrezeptoren hat AF2 des AR geringeres transaktivierendes Potential als AF1 [37, 56], was bedeutet, dass die transkriptionelle Aktivität des AR hauptsächlich von AF1 ausgeübt wird [39].

Kristallographische Röntgenstrukturstudien zeigen, dass die LBD des AR aus zwölf α -Helices und einem β -Faltblatt besteht [57-60]. Diese bilden eine Ligandenbindetasche an die Androgene binden. Die Bindung des Liganden induziert Konformationsänderungen in denen Helix 12 die Tasche wie ein Deckel schließt. Diese Strukturänderungen führen zur Freilegung der NLS und zur Translokalisierung des AR in den Zellkern [61]. Außerdem wird die Bildung von AF2 aus Helix 3, 4, 5 und 12 induziert [62]. Eine hydrophobe Oberfläche wird gebildet, die als Koaktivator tasche bezeichnet wird. Verschiedene Koaktivatoren binden an diese hormoninduzierte Oberfläche, um die Aktivität des AR zu verstärken [63-65].

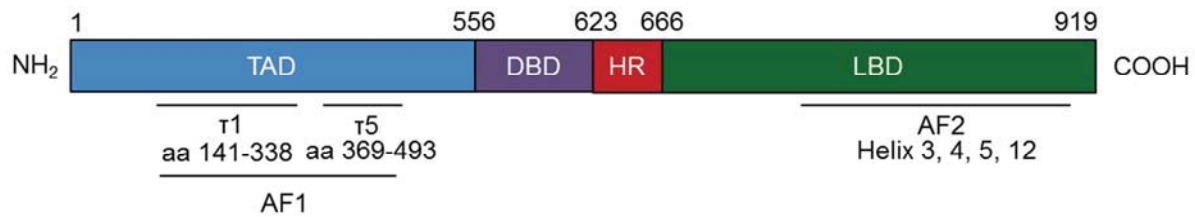


Abbildung 1 Funktionelle Domänen des humanen Androgenrezeptors

Schematische Abbildung des AR. Gekennzeichnet sind die aminoterminal transaktivierende Domäne (TAD), mit *activation function 1* (AF1), die die für die Transaktivierung wichtigen Bereiche $\tau 1$ und $\tau 5$ enthält, die DNA-Bindedomäne (DBD), die Hinge Region (HR) im Zentrum des Proteins, sowie die carboxyterminale Ligandenbindedomäne (LBD), die die für die Transaktivierung schwächere hormonabhängige *activation function 2* (AF2) enthält. Zahlen beschreiben die Aminosäureposition im Protein.

Im Gegensatz zu anderen nukleären Rezeptoren ist die Affinität für die Bindung eines Koaktivators an die Koaktivortasche in Anwesenheit eines Liganden im AR geringer, wie die für bestimmte Bereiche im N-Terminus des Rezeptors [62, 66, 67]. Daraus resultiert die Interaktion von N- und C-Terminus des AR, welche alternative Koaktivatorbindestellen in N-Terminus und Hinge-Region offenlegt [38, 68, 69].

1.2.3 Intramolekulare N- und C-terminale Interaktion des Androgenrezeptors

Die transkriptionelle Aktivität von AF1 und AF2 wird über die androgenabhängige amino- und carboxyterminale- (N/C-) Interaktion reguliert [70-72]. DHT, sowie andere Agonisten, induzieren die N/C-Interaktion [73]. Dagegen hemmen Antagonisten, wie Hydroxyflutamid [70, 74] und Cyproteronazetat [74] diesen Vorgang. Die N/C-Interaktion findet zwischen AF2 in der LBD des AR und dem $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motiv (F Phenylalanin, Q Glutamin, N Asparagin) im N-Terminus des AR statt [67]. AF2 kann außerdem mit dem $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ -Motiv (W Tryptophan, H Histidin, T Threonin) im N-Terminus des Rezeptors interagieren, allerdings mit einer geringeren Affinität [67]. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die Beteiligung von $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ eine stabilisierende Funktion in der Ligandenbindung hat [67]. Die Aktivität von $^{433}\text{WHTLF}^{437}$ ist jedoch ligandenunabhängig [67], wohingegen die N/C-Interaktion von der Hormonbindung abhängig ist. Eine N/C-Interaktion wurde außerdem für Estrogen- [75], Progesteron- [76] und Mineralocorticoidrezeptor [77] beschrieben, auch wenn

Interaktionsmotive bisher nicht bekannt sind. Die Interaktion zwischen N- und C-Terminus ist *in vivo* für die Aktivität des Rezeptors wichtig und spielt in der durch Androgene induzierten Stabilisierung des AR und einer antiparallelen Anordnung der AR-Monomere im AR-Dimer eine Rolle [70, 71, 73, 78, 79].

1.2.4 Transkriptionelle Regulation durch den Androgenrezeptor

Der AR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der nach Bindung des Liganden in den Zellkern wandert und als Homodimer an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte AREs bindet. Diese Elemente befinden sich in Promotor- und Enhancer-Regionen von Zielgenen des AR, wie beispielsweise FK506 Bindeprotein 5 (FKBP5) [80], Kallikrein-2 (KLK2) [81] und prostataspezifisches Antigen (PSA) [82]. Die Konsensussequenz für den AR besteht aus zwei unvollständigen palindromischen 6-Basenpaar-Elementen, die von einem 3-Basenpaar Spacer getrennt sind: 5'-GG(A/T)ACAnnnTGTTCT-3' [83]. Diese Bindestelle kann auch von Progesteron-, Glucocorticoid- und Mineralocorticoidrezeptor erkannt werden. Neben der konventionellen ARE-Konsensussequenz wurden spezifische AREs in androgen-regulierten Genen identifiziert [84-88]. Diese Elemente sind partiell direkte Wiederholungen des kanonischen Hexamer 5'-TGTTCT-3'.

Nach Bindung des Rezeptors an DNA erfolgt die Interaktion mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie. Die Transkription von mRNA benötigt die Rekrutierung der RNA Polymerase II und einen Komplex aus basalen Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Der AR ist in der Lage die basale Transkriptionsmaschinerie an einen Promotor zu rekrutieren, wo er das TATA-Box Bindeprotein TBP und die Helikase TFIIH (Transkriptionsfaktor II H) bindet [30], die Bestandteile des Prä-initiationskomplexes sind. Da Progesteron-, Glucocorticoid- und Mineralocorticoidrezeptor dieselbe konventionelle Konsensussequenz erkennen, ist die Interaktion mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren [89] nötig, die die Spezifität der Zielgenexpression gewährleisten. Darüber hinaus modulieren verschiedene Korregulatoren die Aktivität des AR. Dieser Komplex reguliert die Transkription von Zielgenen.

1.2.5 Koaktivatoren

Obwohl Steroidhormonrezeptoren direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren können, sind andere regulatorischen Proteine in eine spezifischere Effektorfunktion involviert [90]. Korregulatoren werden als von nukleären Hormonrezeptoren rekrutierte Faktoren definiert, die ihre Funktion als Mediatoren zellulärer Antworten auf endokrine Signale ausüben. Grundsätzlich werden diese in Korregulatoren, die die transkriptionelle Aktivität fördern (Koaktivatoren) oder hemmen (Korrepressoren) unterschieden [91-93].

Koaktivatoren werden generell in zwei Familien unterteilt: (a) diejenigen, die Chromatin umorganisieren oder modifizieren und (b) solche, die als Brückenmolekül zwischen Rezeptor und basaler Transkriptionsmaschinerie fungieren und Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie die RNA Polymerase II, rekrutieren oder Bestandteil dieser sind [54, 94].

Von einer Vielzahl an Proteinen weiß man dass sie eine Funktion als Koaktivator haben [95]. Zu diesen zählen allgemeine Proteine, wie die der SRC/p160 (*steroid receptor coactivator*) Familie, CBP/p300 (*cAMP response element binding protein-binding protein*), der SWI/SNF (*switch/sucrose non fermentable*)-Komplex, sowie die AR-spezifischen Koaktivatoren ARA54 und ARA70 (Androgenrezeptor-assoziiertes Protein 54 und 70) [92, 96].

1.2.6 Interaktion zwischen Koaktivatoren und Androgenrezeptor

Koaktivatoren der p160-Familie interagieren mit $\tau 5$ in AF1 und AF2 des AR [97-100]. Die Interaktion mit AF1 wird über einen glutaminreichen Bereich reguliert, wogegen die Bindung an AF2 über ein LXXLL-Motiv (L Leucin, X jede beliebige Aminosäure) erfolgt [63-65, 97, 101-103]. Das LXXLL-Motiv ist charakteristisch für die p160-Familie, zu der SRC-1, SRC-2 und SRC-3 zählen [63]. Kristallstrukturanalysen von nukleären Rezeptoren und LXXLL-Motiven zeigen, dass AF2 des AR SRC-1 und -2 über das LXXLL-Motiv rekrutiert [103]. Hormoninduzierte Konformationsänderungen im AR resultieren in einer geänderten Orientierung hydrophober und geladener Aminosäuren in Helix 12, wodurch die Koaktivatortasche gebildet und die Bindung von Koaktivatoren ermöglicht wird [97, 104]. Diese hydrophobe Tasche bindet die aus dem LXXLL-Motiv

geformte α -Helix von p160-Koaktivatoren [65]. Während LXXLL-Motive aus p160-Koaktivatoren AF2 der meisten nukleären Rezeptoren stark binden [54, 55], ist die Interaktion mit AF2 des AR schwächer [72]. Die für AF2 gemessenen Dissoziationskonstanten verschiedener LXXLL-Motive variieren stark, wobei andere keine Bindung zeigen [97]. Dies ist vermutlich die Folge des Einflusses benachbarter Aminosäuren, die AF2 die Selektion zwischen verschiedenen Motiven ermöglicht.

Die Interaktion von Koaktivatoren mit dem AR erfolgt jedoch nicht nur über das LXXLL-Motiv. Das FXXLF (F Phenylalanin, X jede beliebige Aminosäure)-Motiv, wie es ursprünglich im N-Terminus des AR identifiziert wurde, ist eine Signatur, die ebenfalls in Koaktivatoren vorkommt und an AF2 des AR bindet. Das FXXLF-Motiv kommt beispielsweise in ARA70 und ARA54 vor [105]. FXXLF-Motive zeigen eine stärkere Bindung an AF2 als viele LXXLL-Motive [97]. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass sich Seitenketten in AF2 umorganisieren, um entweder ein FXXLF- oder LXXLF-Motiv zu binden [97]. Der Koaktivator MED1 (*mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1*) bindet unabhängig von einem LXXLL-Motiv über zwei nicht-kanonische α -Helices an $\tau 1$ im N-Terminus des AR [106]. Eine weitere Klasse von Koaktivatoren umfasst diejenigen, die an die DBD/Hinge-Region des AR binden. Zu diesen zählt BAF57 (*BRG1-associated factor 57*), eine SWI/SNF-Untereinheit, die über eine N-terminale prolinreiche- und eine HMG (*high mobility group*)-Domäne agiert [107]. Dies zeigt, dass verschiedene Koaktivatoren unterschiedliche Domänen verwenden, um die Transaktivierung des AR zu verstärken. Mit welchen Erkennungsmotiven diese an den AR binden, muss allerdings noch identifiziert werden.

1.2.7 Regulation der Koaktivatorbindung

Kristallstrukturanalysen zeigen, dass die Bindestellen des LXXLL- und des $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motivs im N-Terminus des AR in AF2 überlappen [62, 104]. Basierend auf Phagendisplayanalysen [62, 108, 109] und Bindungsaffinitätsmessungen [104] konnte gezeigt werden, dass AF2 im Vergleich zum LXXLL-Motiv eine größere Affinität für das $^{23}\text{FQNLF}^{27}$ -Motiv hat. Während die N/C-Interaktion des AR bereits nach Ligandenbindung stattfindet, löst sich diese nach Bindung des Rezeptors an DNA wieder

und reguliert vermutlich so die Rekrutierung von Koaktivatoren in diesem Stadium [110].

Die Konkurrenz von ²³FQNLF²⁷- und LXXLL- oder FXXLF-Motiv um die Bindung an AF2 [105], kann auf die N/C-Interaktion des AR aktivierend oder reprimierend wirken, was nicht immer mit der folgenden Transaktivierung oder Reprimierung des AR übereinstimmt [111]. SRC-1 und -2, die LXXLL-Motive besitzen, verstärken beispielsweise die N/C-Interaktion, wie auch die transkriptionelle Aktivität des AR [111]. Dagegen wird die N/C-Interaktion des AR von dem Koaktivator Rad9, welcher ein FXXLF-Motiv besitzt, reprimiert, und von dem Korrepressor ARA67 verstärkt [111].

Von einigen zell- und gewebespezifischen Koaktivatoren wird vermutet, dass sie selektiv die Zugänglichkeit von AF2 für andere Koaktivatoren erhöhen und so deren Interaktion regulieren. Die Korregulatoren Melanoma Antigen-11 (MAGE-11) und Cyclin D1 binden an das ²³FQNLF²⁷-Motiv des AR auf konkurrierende Weise gegenüber der N/C-Interaktion des AR [112-114] und verstärken die Transaktivierung des Rezeptors durch die Exposition von AF2 für die Rekrutierung anderer Koaktivatoren und die direkte Interaktion mit p160- und p300-Koaktivatoren [115, 116].

1.2.8 Funktionen von Koaktivatoren

Eine der primären Funktionen von Koaktivatoren ist die Stabilisierung des AR in seiner aktiven Konformation und die Öffnung der Chromatinstruktur vom inaktiven Hetero- zum aktiven Euchromatin, was den Zugang der basalen Transkriptionsmaschinerie an den Promotor ermöglicht, um die Transkription zu initiieren. Dies geschieht durch die Rekrutierung von Histonacetyltransferasen. p160-Koaktivatoren besitzen eine solche Aktivität [117, 118] und modifizieren darüber hinaus Chromatin durch die Interaktion mit weiteren Histonacetyltransferasen, wie CBP/p300 und p/CAF (p300/CBP-assoziierter Faktor) [119-121]. Diese werden von p160-Proteinen an Promotoren von Zielgenen rekrutiert [78, 122] und acetylieren Histone und Steroidhormonrezeptoren [50, 54, 94]. Die Acetylierung von Histonen führt zur Relaxation von Chromatin und erleichtert die Gentranskription. Die Acetylierung des AR ist essentiell für dessen transkriptionelle Aktivität [50].

Neben der Histonacetylierung ist die Methylierung von Histonen eine wichtige Funktion von Koaktivatoren wie CARM1 (Koaktivator-assoziierte Argininmethyltransferase 1) und PRMT1 (Protein Arginin *N*-Methyltransferase 1) [123, 124]. Diese interagieren mit p160 und verstärken die biologische Aktivität von Koaktivatoren durch die Methylierung von Histonen und anderen Proteinen im Transkriptionsinitiationskomplex [123-126].

Zudem existieren Koaktivatoren, die kein bisher bekanntes AR-Bindemotiv oder keine Histonmodifikationsfunktion besitzen, die die Aktivität des AR jedoch beeinflussen. Zu diesen zählen ARIP3 (AR-interagierendes Protein 3), Untereinheiten des TRAP (Thyroidhormonrezeptor-assoziierten Protein)-Mediatorkomplex, β -Catenin, Cyclin E, der Pionierfaktor FoxA1 (*forkhead box A1*), Histonchaperon NPM1 (Nucleophosmin 1) und Kochaperon Bag-1L (Bcl-2-assoziiertes Athanogen 1L). Einige dieser Faktoren, wie ARIP3, das synergistisch mit SRC-2 agiert, fungieren als Brückenmolekül zwischen AR und Proteinen mit HAT-Aktivität [127]. Die genaue Funktion der meisten ist bislang allerdings noch ungeklärt.

1.2.9 Die Rolle von Koaktivatoren in der Entwicklung von Prostatakrebs

Koaktivatoren des AR sind therapeutische Ziele, die für die Behandlung von Prostatakrebs vielversprechend sind [31, 128, 129]. Es wird angenommen, dass die Expression von Koaktivatoren in Prostatakrebs die Spezifität der AR-Aktivität maßgebend bestimmt [130]. Verschiedene Koaktivatoren werden während der Progression von Prostatakrebs aberrant exprimiert, wo ihre Expression häufig mit einer schlechten Prognose korreliert. Darüber hinaus können Änderungen in der Koaktivatorexpression wesentlich zur Aktivität des AR beitragen.

PCR-Studien bestätigen die Expression der meisten Koaktivatoren in der Mehrheit der kultivierten Prostatakrebszellen [131]. Viele Koaktivatoren, wie die p160-Familie, CBP oder Bag-1L werden in Primärtumoren und Metastasen exprimiert oder ihre Expression korreliert mit dem Grad des Prostatakarzinoms, bis hin zum kastrationsresistenten Stadium [132-136].

Prostatakrebszellen sind in der Lage sich an eine Umgebung mit einem geringen Androgenniveau durch verschiedene Mechanismen anzupassen. Man geht davon aus,

dass die Überexpression verschiedener Koaktivatoren einer dieser Mechanismen ist, indem sie den AR gegenüber geringeren Androgenkonzentrationen sensibilisieren. Einer dieser Koaktivatoren ist Bag-1L [137]. Darüber hinaus führt die verstärkte Expression bestimmter Koaktivatoren, zu einer Resistenz gegenüber Antiandrogenen. Von den bisher bekannten AR-Koaktivatoren [138] sind CBP, ARA70, ARA55, ARA54 und Bag-1L die Einzigen, von denen bekannt ist, dass sie diese Fähigkeit besitzen [132, 137, 139-141]. Dies zeigt, dass Prostatakrebszellen in verschiedener Hinsicht von einer verstärkten Expression von Koaktivatoren profitieren.

Um eine in rezidiven Stadien wirksame Therapie zu entwickeln, ist die Blockierung der Funktion jener Koaktivatoren von Interesse, die spezifisch in Prostatatumoren überexprimiert sind, dort das Wachstum und Überleben der Tumorzellen fördern und die Resistenz gegenüber bekannter Behandlungsmethoden mitverursachen. Basierend auf der Analyse der Funktion solcher Koaktivatoren könnten Therapeutika entwickelt werden, die spezifisch das Wachstum maligner Zellen hemmen. Bag-1L ist einer der wenigen Koaktivatoren, die das Wachstum maligner Zellen beeinflussen und Antiandrogene hemmen.

1.3 Die Bag-1-Familie

Bag-1L ist ein Mitglied der Bag-1-Familie, die einer evolutionär konservierten Gruppe von Proteinen angehört, die in verschiedenen Spezies, wie Hefe (Sn1P), Pflanzen (AtBAG) und Säugern (Bag) gefunden wird [142-144]. Das Bag-1 Gen wurde erstmals mit Hilfe einer Klonierungstechnik zur Identifikation von Interaktionspartnern von Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) identifiziert [145]. Die Überexpression dieses Gens zusammen mit Bcl-2 erhöht die Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli. Dieses Gen wurde als Bag-1, Bcl-2 assoziiertes Athanogen (vom griechischen a, anti- und thanaton, Tod) 1 bezeichnet.

1.3.1 Bag-1-Isoformen und die Regulation ihrer Expression

Im Menschen gehören vier Isoformen zur Bag-1-Familie (Bag-1L/p50, 50 kDa; Bag-1M/RAP46/HAP46, 46 kDa; Bag-1/p36, 36 kDa; Bag-1S/p29, 29 kDa), die über unterschiedliche Translationsinitiationsstellen, von der gleichen mRNA kodiert werden [146]. Die Translationsinitiationsstelle der größten Isoform Bag-1L besteht aus einem nicht-kanonischen CUG, während die anderen drei Isoformen über die darauf folgenden *in-frame* AUG-Startcodons gebildet werden [146]. Alle Bag-1-Isoformen teilen den gleichen Carboxyterminus, unterscheiden sich aber in unterschiedlich langen Aminotermini [147] (Abbildung 2).

Die Translation von Bag-1S kann zusätzlich über eine interne ribosomale Eintrittsstelle erfolgen. Diese ermöglicht eine vom aminoterminalen Ende unabhängige Proteinexpression und ein konstantes Bag-1-Level als schnelle Reaktion auf Stress [148].

1.3.2 Domänen der Bag-1-Proteine

Bag-1-Proteine sind in verschiedene Prozesse und Signalwege, wie Stress, Apoptose, Proliferation und Zellwachstum involviert. Vorgänge, die auch für die Entstehung von Krebs von Bedeutung sind. Diese weitgefächerten Funktionen werden über verschiedene Domänen in den Familienmitgliedern reguliert (Abbildung 2).

Carboxyterminal besitzen alle vier Isoformen eine konservierte Bag-Domäne. Über diese interagieren Bag-1-Proteine mit einer Vielzahl an Proteinen, zu denen Bcl-2 [145] und das molekulare Chaperon Hsp70 [149] zählen (Tabelle 1). Nukleäre magnetische Resonanz, Röntgenstrukturkristallographie und limitierte Proteolysestudien beschreiben die Bag-Domäne als 110 Aminosäuren langen Bereich, der aus drei antiparallelen α -Helices besteht [142, 150].

An die Bag-Domäne grenzt die Ubiquitin-*like* Domäne (ULD). Diese reguliert die Funktion von Chaperonen und dem Proteasom, indem sie simultan mit diesen interagiert [151, 152]. Die ULD interagiert mit dem 26S Proteasom [151] und reguliert mit der E3 Ubiquitinligase CHIP (*carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*) die Aktivität des Hsc70/Hsp70 Chaperonsystems und damit Proteinfaltung und -degradation [152, 153] (Tabelle 1).

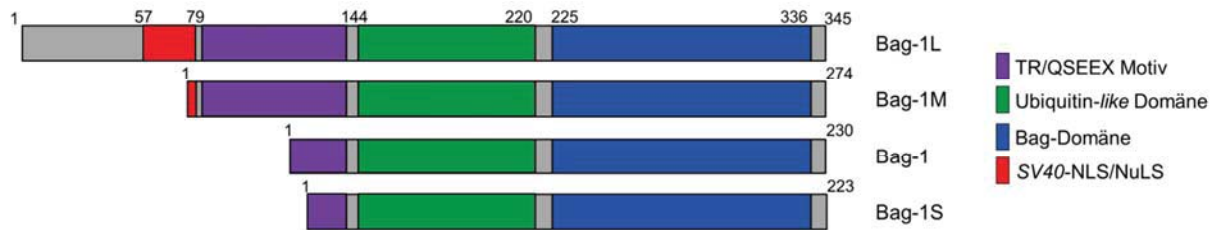


Abbildung 2 Die Bag-1-Familie

In Blau die konservierte Bag-Domäne. In Grün die Ubiquitin-*like* Domäne. In Violett die TR/QSEEX-Wiederholungen. In Rot das *SV40 large T antigen*-ähnliches Kernlokalisationsignal (*SV40-NLS*) bzw. nukleoläres Lokalisationsignal (NuLS).

Aminoterminal besitzen Bag-1-Proteine eine unterschiedliche Anzahl an Hexapeptidwiederholungen (TR/QSEEX-Motiv, T Theronin, R Arginin, Q Glutamin, S Serin, E, Glutaminsäure, X jede beliebige Aminosäure). Diese weisen eine α -helikale Struktur auf, in der saure Aminosäuren auf eine Seite ausgerichtet sind [154]. Diese Motive sind phosphoryliert [155] und repräsentieren Phosphorylierungsstellen bestimmter Kinasen [149]. Die Funktion der TR/QSEEX-Motive ist bislang unklar.

Bag-1L ist das einzige Mitglied der Bag-1-Familie, das eine *SV40 large T Antigen*-ähnliche NLS besitzt und ist aufgrund dieser das einzige Bag-1-Protein, das ausschließlich im Nukleus zu finden ist [156, 157]. Die NLS von Bag-1L ist beiderseits von basischen Aminosäuren umgeben und Teil eines nukleolären Lokalisationssignals, das dem des MDV (*Marek's disease virus*) MEQ-Protein [158], HIV-I (*human immunodeficiency virus type I*) Rev-Protein [159] und HTLV-I (*human T-cell leukemia virus type I*) Rex-Protein ähnelt [160]. Aufgrund dieses ist Bag-1L auch in Nukleoli lokalisiert [161, 162].

1.3.3 Funktionen von Bag-1-Proteinen

1.3.3.1 Bag-1 in der Regulation von Proliferation und Apoptose

Bag-1-Proteine wurden zunächst als Interaktionspartner von Bcl-2 identifiziert. Sie haben einen synergistischen Effekt auf die Inhibition der Apoptose, wenn sie mit Bcl-2 in der lymphoiden Jurkat Zelllinie koexprimiert werden [145] (Tabelle 1). Seitdem wurden

verschiedene Mechanismen beschrieben, um die Funktion von Bag-1 in Zellproliferation und Apoptose zu erklären.

Bag-1 ist durch die Interaktion mit der Serin/Threonin-Kinase Raf-1 (*rat fibrosarcoma* 1) in die Regulation der Zellproliferation und des Zellwachstums involviert [163] (Tabelle 1.1). Raf-1 phosphoryliert und aktiviert die MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade, was zu einer gesteigerten Proliferation führt [164]. Bag-1 reichert Raf-1 in der Nähe der Mitochondrienmembran an, wo es mit Bcl-2 interagiert. Dies ermöglicht Raf-1 Proteine zu phosphorylieren, die es normalerweise nicht erreicht. Bag-1-Proteine interagieren auch mit B-Raf in einem Komplex mit Akt (Proteinkinase B) und Hsp70, was zur Inhibition der Apoptose führt. In einem Bag-1 *knockout* Mausmodell führt die Zerstörung dieses Komplexes zu einer frühen Letalität in hämatopoetischen und neuronalen Zellen [165].

Tabelle 1 Interaktionspartner und Effekte der Bag-1-Proteine
(modifiziert nach [166])

Isoform	Interaktionspartner	Wirkung	Referenz
alle Isoformen	Bcl-2	Hemmung der Apoptose	[145]
alle Isoformen	Hsp70	Kochaperon	[167]
alle Isoformen	CHIP	Proteasomale Degradation	[153]
Bag-1; Bag-1S	Raf-1	Proliferation	[163, 168]
Bag-1L, Bag-1M, Bag-1	VDR	Aktivierung transkriptioneller Aktivität Inhibition transkriptioneller Aktivität Metabolismus	[169-171]
Bag-1L; Bag-1M	GR	Repression transkriptioneller Aktivität	[172-174]
Bag-1L; Bag-1M	MR	Repression transkriptioneller Aktivität	[175]
Bag-1L; Bag-1M	PR	Repression transkriptioneller Aktivität	[175]
Bag-1L	ER	Aktivierung transkriptioneller Aktivität	[176]
Bag-1L	AR	Aktivierung transkriptioneller Aktivität	[137]

1.3.3.2 Bag-1-Proteine in ihrer Rolle als Kochaperone

Eine der am besten studierten Funktionen der Bag-1-Proteine ist die als Kochaperon. Kochaperone regulieren die Aktivität von Chaperonen. Bag-1 fördert die Substratfreisetzung von Hsp70 [142, 167, 177-179] und interagiert über die Bag-Domäne mit diesem [142, 150] (Tabelle 1).

Die Missfaltung von Proteinen, wie sie durch zellulären Stress nach Hitzeschock oder Hypoxie erfolgt, löst einen Mechanismus aus, der Zellen vor dem Sterben schützt. In diesem Kontext spielen Bag-1-Proteine durch ihre Interaktion mit Hsp70 eine überlebensfördernde Rolle. Darüber hinaus ist bekannt, dass Hitzeschockproteine eine Funktion in der Regulation nukleärer Hormonrezeptoren spielen und beispielsweise für ihre Konformationsänderungen nach Ligandenbindung wichtig sind. Bag-1 interagiert mit nukleären Hormonrezeptoren und Hitzeschockproteinen und könnte so eine Rolle in der Modulation beider Komponenten spielen [180]. Bag-1 hemmt beispielsweise in Abhängigkeit von Hsp70 die Faltung des Glucocorticoidrezeptors, einem Steroidhormonrezeptor, dessen Komplexbildung mit dem Hitzeschockprotein 90 und die Bindung des Liganden Dexamethason an den Rezeptor [181]. Darüber hinaus binden Bag-1-Proteine Vitamin D-Metaboliten in Abhängigkeit von Hsp70, was zu einer gesteigerten Aktivität des Rezeptors führt [182]. Dies zeigt, dass Bag-1-Proteine Steroidhormonrezeptoren durch Hsp70 regulieren und nicht nur eine Funktion als Kochaperone, sondern auch als Regulatoren der Transkription ausüben, indem sie die Aktivität verschiedener Steroidhormonrezeptoren beeinflussen.

1.3.3.3 Bag-1 in der Regulation der Transkription

Bag-1-Proteine können die Transkription durch Bindung an DNA oder durch die Beeinflussung der Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren, wie nukleären Hormonrezeptoren, regulieren.

1.3.3.3.1 Die DNA-Bindung von Bag-1-Proteinen beeinflusst die Genexpression

Die Regulation der Genexpression durch Bag-1-Proteine erfolgt vermutlich durch Bindung an bestimmte DNA-Bindestellen. Es konnte gezeigt werden, dass Bag-1M DNA über eine 10 Aminosäuren lange Sequenz aus zwei *clustern* aus drei Lysinen und drei Argininen (MKKKTRRRST) im N-Terminus binden kann [183]. Dieses unspezifische DNA-Bindemotiv liegt im Bereich der *SV40-NLS*, die nur in Bag-1M und Bag-1L zu finden ist [183]. Bag-1L aktiviert die Transkription einer Reihe von Promotoren [184] und Bag-1M zeigt ähnliche Effekte nach Hitzeschock [183]. Auch am Beispiel viraler Gene wurde gezeigt das Bag-1 an *nuclear factor-1* Sequenzen bindet und die Aktivität des John Cunningham Virus (JCV) early Promotor verstärkt [185]. Am Beispiel von Bag-1M wurde gezeigt, dass dieses die transkriptionelle Aktivität des Cytomegalovirus (CMV) *early region* Promotor stimuliert [186]. Einerseits führt die Deletion der Hsp70/Hsc70-Bindestelle zum Verlust der CMV-Stimulation, was eine Involvierung von Hsp70 nicht ausschließt, zum anderen reduziert eine Mutation im N-Terminus von Bag-1M, die seine Bindung an DNA stört, dessen Fähigkeit die CMV-Promotoraktivität zu verstärken. Dies impliziert eine Beteiligung der N-terminalen DNA-Bindestelle und C-terminalen Hsp70/Hsc70-Bindestelle an der Verstärkung der CMV-Promotoraktivität. Ob die Regulation der Genexpression direkt oder indirekt stattfindet ist bislang jedoch nicht geklärt.

1.3.3.3.2 Bag-1-Proteine und nukleäre Hormonrezeptoren

Bag-1-Proteine binden nukleäre Hormonrezeptoren, regulieren deren transkriptionelle Aktivität und nehmen so Einfluss auf Prozesse wie Zellwachstum, Motilität, Zellteilung, Apoptose, Differenzierung und Morphologie [180]. Bag-1 wurde erstmals als Interaktionspartner des Glucocorticoidrezeptors identifiziert [187] (Tabelle 1). Spätere Studien belegen die Interaktion mit Vitamin D₃-, Retinsäure-, Mineralocorticoid-, Progesteron-, Estrogen- und Androgenrezeptor (Tabelle 1). Bag-1 bindet alle bisher untersuchten nukleären Rezeptoren mit seinem C-terminalen Ende [137, 169, 172, 188]. Da dieser Bereich auch Hsp70 bindet [167], wird davon ausgegangen, dass Bag-1 die Regulation nukleärer Rezeptoren über Hsp70 vermittelt. Der Einfluss von Bag-1-Proteinen auf nukleäre Rezeptoren kann aktivierend oder reprimierend sein, abhängig

vom nukleären Rezeptor und/oder Zelltyp. Gleichzeitig variiert der Einfluss der Bag-1-Isoformen auf die Rezeptoren.

Bag-1L und Bag-1M aber nicht Bag-1 oder Bag-1S inhibieren die hormoninduzierte Transaktivierung von Glucocorticoid-, Mineralocorticoid- und Progesteronrezeptor [172, 173, 175]. Bag-1M hemmt darüber hinaus die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an DNA [172]. Die Interaktion der Rezeptoren mit Bag-1L und Bag-1M ist von der Bag-Domäne abhängig und scheint nur über Bereiche im Rezeptor vermittelt zu werden, die Hsp70 binden [174, 175, 189].

Im Gegensatz dazu ist Bag-1L die einzige Isoform, die die Aktivität des Vitamin D₃, Androgen- und Estrogenrezeptors (ER) reguliert. Der Effekt von Bag-1L auf den Vitamin D₃ Rezeptors scheint zelltypspezifisch zu sein und kann inhibierend [170] oder aktivierend sein [169, 171]. Studien belegen dagegen, dass Bag-1L die Transaktivierung von AR und ER α und β verstärkt [137, 176]. Die Interaktion von Bag-1L mit Vitamin D₃ Rezeptor und AR wird über Hsp70 und die Bag-Domäne vermittelt [169, 190, 191], wobei N-terminale Bag-1L-Sequenzen ebenfalls beteiligt sind [170, 190]. Darüber hinaus tragen sowohl der N-, als auch der C-Terminus von Bag-1L zur Verstärkung der AR-, ER- und Vitamin D₃ Rezeptor-Aktivität bei. Einerseits stören die Deletion der Bag-Domäne und Punktmutationen, die die Interaktion mit Hsp70/Hsc70 hemmen, den positiven regulatorischen Effekt von Bag-1L auf den AR und Vitamin D₃ Rezeptor [150, 169, 190, 191], andererseits zeigt die Fusion von Bag-1 oder Bag-1M mit einer *SV40*-NLS, die das rekombinante Fusionsprotein in den Zellkern transportiert, keinen oder geringen Einfluss auf die AR und ER-Aktivität [176, 190, 191]. Dies zeigt, dass neben der Bag-Domäne und einer NLS andere Bereiche im N-Terminus von Bag-1L wichtig sind, um die Aktivität dieser Rezeptoren zu beeinflussen.

Auch wenn die Regulation von Chaperonen durch Bag-1 ein möglicher Mechanismus für die Regulation nukleärer Hormonrezeptoren sein mag, ist es unwahrscheinlich, dass es einen einzelnen Mechanismus gibt, der für die Wirkung von Bag-1 auf alle nukleären Hormonrezeptoren gültig ist. Zum einen weil unterschiedliche Isoformen verschiedene Einflüsse auf die Rezeptoren haben, die teilweise auch unabhängig von Hsp70/Hsc70 sind und zum anderen, weil nukleäre Hormonrezeptoren von Bag-1 sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden.

1.3.4 Bag-1 als prognostischer Marker und seine Funktion in der Tumorprogression

Bag-1 hat durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen das Potential diverse Funktionen, die für das normale und maligne Zellwachstum wichtig sind, zu beeinflussen. *In vitro* und *in vivo* Überexpressionsstudien deuten darauf hin, dass das Bag-1-Level als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf genutzt werden könnte. Zudem weisen Änderungen des Bag-1-Levels daraufhin, dass Bag-1 während der Tumorprogression eine kritische Rolle spielen könnte.

1.3.4.1 Bag-1 als prognostischer Marker

Die Bag-1-Expression ist in verschiedenen Krebsarten erhöht und in die Entstehung und den Fortschritt der Krankheit involviert. Bag-1 konnte in Patientenproben von kolorektalen Tumoren [192], Kehlkopftumoren [193], Cervixtumoren [194] und follikulären Schilddrüsenkarzinomen [195] verstärkt detektiert werden. Ein reduziertes nukleäres und erhöhtes zytoplasmatisches Bag-1-Level korreliert zum einen mit invasiven Brustkarzinomen [196] und zum anderen steht eine gesteigerte nukleäre Expression mit einer schlechten Prognose in Studien an Brustkrebs in Verbindung [197]. Im Gegensatz dazu wurde ein erhöhtes Bag-1-Level auch als prädiktiv für eine bessere Heilungs- und Überlebensrate beschrieben, wenn es in frühen Brustkrebsstadien detektiert wird [198-200]. In Lungenkrebs konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden [201]. Ein erhöhtes Bag-1-Level wurde darüber hinaus in Patienten mit Prostatakrebs, die nach Prostatektomie nicht auf eine neoadjuvante Hormontherapie reagierten, detektiert und mit einer aggressiveren Tumorform in Verbindung gebracht [202]. Darüber hinaus zeigen Studien, dass Bag-1L in kastrationsresistentem Prostatakrebs überexprimiert und sein Gen amplifiziert ist [135, 136]. Diese Studien weisen darauf hin, dass die Expression von Bag-1 in einigen Krebsarten als prognostischer Marker dienen könnte. Weitere Analysen sind jedoch erforderlich, die Aufschluss über die Expression bestimmter Isoformen oder auch Spleißvarianten geben, um präzisere Aussagen treffen zu können.

1.3.4.2 Bag-1 in der Tumorprogression

Einer der wichtigsten Punkte, die das Interesse an Bag-1 in der Tumorentstehung wecken, ist seine Fähigkeit Apoptose, die z.B. durch membranständige *death*-Rezeptoren, den Entzug von Wachstumsfaktoren, zytotoxische, in der Krebstherapie eingesetzte Medikamente und Strahlentherapie induziert wird, zu hemmen. Verschiedene Signalwege, wie die Förderung von Überlebensstimuli und die Hemmung der Apoptose über Raf-1 [163, 168], die Regulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 [145] oder die Kontrolle nukleärer Hormonrezeptoren [180] könnten involviert sein.

In vitro und *in vivo* Studien zeigen, dass Bag-1-Proteine die Krebszellmigration erhöhen, was ihnen eine mögliche Rolle in der Metastasenbildung zuschreibt [165, 203-205]. Außerdem stimmt die Überexpression von Bag-1-Proteinen in Krebs mit deren anti-apoptotischer Funktion überein, die Tumorzellen einen Überlebensvorteil verschafft. In einigen Fällen wird beschrieben, dass Bag-1-Isoformen unterschiedliche anti-apoptotische Funktionen in Tumorzellen übernehmen. Bag-1L, Bag-1M und/oder Bag-1 erhöhen die Resistenz von Cervixkarzinom- [206] und Brustkrebszellen [207] gegenüber Chemotherapeutika. Bag-1L wirkt außerdem dem Antiandrogen Cyproteronazetat, das in der Prostatakrebstherapie eingesetzt wird, entgegen [137]. Diese Studien zeigen, dass die Funktion von Bag-1-Proteinen in der Krebsentstehung von verschiedenen Faktoren, wie Zelltyp und Bag-1-Isoform abhängig ist.

Das Expressionsmuster von Bag-1-Proteinen ändert sich während der Tumorprogression, auf welcher molekularen Instanz diese in die Entstehung von Krebs involviert sind, ist bislang jedoch unklar. Die Entstehung von Krebsarten wie des Brust- oder Prostatakarzinoms ist stark von Androgenen, bzw. Estrogenen abhängig, die über AR und ER agieren. Zum einen ist Bag-1L die einzige Bag-1-Isoform, die Einfluss auf die Regulation von AR und ER nimmt und zum anderen ist Bag-1L einer der wenigen Koaktivatoren, die Chemotherapeutika oder Antiandrogenen entgegenwirken. Dies macht Bag-1L zu einem interessanten Kandidaten, um den Mechanismus der Rezeptorregulation in Krebszellen zu untersuchen, was Aussichten auf neue therapeutische Ziele mit sich bringen könnte.