

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	
1.1 Prostatakrebstherapie: Ein Einblick in die Geschichte.....	1
1.2 Der Androgenrezeptor	2
1.2.1 Mechanismus der Androgenrezeptor-Aktivierung	2
1.2.2 Domänen des Androgenrezeptors	3
1.2.3 Intramolekulare N- und C-terminale Interaktion des Androgenrezeptors	5
1.2.4 Transkriptionelle Regulation durch den Androgenrezeptor	6
1.2.5 Koaktivatoren.....	7
1.2.6 Interaktion zwischen Koaktivatoren und Androgenrezeptor	7
1.2.7 Regulation der Koaktivatorbindung	8
1.2.8 Funktionen von Koaktivatoren	9
1.2.9 Die Rolle von Koaktivatoren in der Entwicklung von Prostatakrebs.....	10
1.3 Die Bag-1-Familie	11
1.3.1 Bag-1-Isoformen und die Regulation ihrer Expression.....	12
1.3.2 Domänen der Bag-1-Proteine	12
1.3.3 Funktionen von Bag-1-Proteinen.....	13
1.3.3.1 Bag-1 in der Regulation von Proliferation und Apoptose	13
1.3.3.2 Bag-1-Proteine in ihrer Rolle als Kochaperone	15
1.3.3.3 Bag-1 in der Regulation der Transkription.....	15
1.3.3.3.1 Die DNA-Bindung von Bag-1-Proteinen beeinflusst die Genexpression	16
1.3.3.3.2 Bag-1-Proteine und nukleäre Hormonrezeptoren	16
1.3.4 Bag-1 als prognostischer Marker und seine Funktion in der Tumorprogression.....	18
1.3.4.1 Bag-1 als prognostischer Marker	18
1.3.4.2 Bag-1 in der Tumorprogression	19
2 Ziel der Arbeit	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Chemikalien	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3 Bakterien.....	27

3.1.4	Zelllinien	27
3.1.5	Antikörper	29
3.1.6	Peptide und Oligonukleotide	29
3.1.7	Enzyme	29
3.1.8	Plasmide	30
3.1.9	Messgeräte und Computersoftware	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.2.2	Restriktionsverdau, Extraktion von DNA aus Agarosegelen und Ligation	36
3.2.3	QuickChange® Mutagenese PCR	37
3.2.4	Oligonukleotid-Annealing und Ligation des Doppelstrangs in einen Expressionsvektor	38
3.2.5	Transformation, Einfrieren und erneute Kultivierung chemokompetenter Bakterien	40
3.2.6	Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präparation)	41
3.2.7	Kultivierung und Langzeitaufbewahrung von Zellen	43
3.2.8	Transfektion von Zellen mit siRNA und Plasmid-DNA	44
3.2.9	Kolonienbildungs-Assay	46
3.2.10	Analyse der ligandenabhängigen und -unabhängigen mRNA-Expression in quantitativen <i>realtime</i> PCR Analysen	47
3.2.11	Immunfluoreszenz	51
3.2.12	Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.2.13	SDS-PAGE und Western Blot Analyse	52
3.2.14	Proteinexpression und Aufreinigung aus Bakterien	54
3.2.15	GST <i>Pull-down</i> Analysen	55
3.2.16	Fluoreszenzpolarisation	56
3.2.17	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	57
3.2.18	Reportergenanalysen	59
4	Ergebnisse	63
4.1	Bag-1 ist für die Aktivität des Androgenrezeptors wichtig	63
4.2	Die Bag-Domäne und der N-Terminus von Bag-1L interagieren mit dem Androgenrezeptor	66
4.3	Der N-Terminus von Bag-1L hat einen dominant-negativen Effekt	69
4.3.1	Die N-terminale Sequenz von Bag-1L ist im Nukleus lokalisiert	69
4.3.2	Der Bag-1L N-Terminus reduziert den Bag-1L Effekt	70
4.3.3	Der N-Terminus von Bag-1L beeinflusst p160- und CBP/p300-Koaktivatoren negativ	70
4.3.4	Die N-terminale Sequenz von Bag-1L wirkt negativ auf die liganden-abhängige und -unabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors	72
4.4	Die N-terminale Sequenz von Bag-1L hemmt Chromatinbindung und N/C-Interaktion des Androgenrezeptors	75
4.4.1	BagN128 reduziert die Chromatinbindung des Androgenrezeptors	75

4.4.2	BagN128 reduziert die N/C-Interaktion des Androgenrezeptors.....	76
4.5	Identifizierung eines Hexapeptidmotivs für die Bindung des Androgenrezeptors.....	78
4.6	Der N-Terminus von Bag-1L hat unterschiedliche Einflüsse auf verschiedene Steroidhormonrezeptoren.....	81
4.7	Die N-terminale Sequenz von Bag-1L hemmt hormonabhängiges Prostata- und Brustkrebszellwachstum	84
4.8	Die Interaktion der N-terminalen Bag-1L-Sequenz mit der Ligandenbindedomäne des Androgenrezeptors.....	87
4.9	Ein Sequenzabgleich bestätigt die Konservierung des GARRPR-Motivs in Säugetieren und Androgenrezeptor bindenden Proteinen	94
4.10	Die Integrität des GARRPR-Motivs ist für die Bindung des Bag1L N-Terminus an den AR und seinen Einfluss auf das Zellwachstum wichtig.....	98
4.11	Mutationen im GARRPR-Motiv stören die Funktion von Bag-1L.....	101
5	Diskussion	105
5.1	Bag-1 reguliert die androgenabhängige Genexpression und bindet Chromatin.....	106
5.2	Identifikation eines neuen Motivs (GARRPR) für die Bindung nukleärer Rezeptoren	107
5.3	Das GARRPR-Motiv beeinflusst die Funktion des Androgenrezeptors	110
5.4	Der N-Terminus von Bag-1L reduziert die ligandenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors.....	112
5.5	Das GARRPR-Motiv in der Regulation von Prostata- und Brustkrebszellwachstum	113
5.6	Das GARRPR-Motiv ist evolutiv konserviert und Bestandteil von Androgenrezeptor bindenden Proteinen	114
5.7	Modell der durch Bag-1L regulierten Androgenrezeptor-Aktivität.....	118
6	Literatur	121
	Danksagung.....	XV