

**Aus dem
Max-Planck-Institut für Psychiatrie München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Holsboer

**Der Einfluss des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2
(XAP2) auf die Funktion des Glukokortikoidrezeptors**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Anna Maria Länger
aus
München**

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein
Prof. Dr. med. M.-C. Jung

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. T. Rein

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2008

Für meine Mutter

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei **Prof. Dr. Dr. F. Holsboer** für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in dem überaus anregenden und fördernden wissenschaftlichen Umfeld des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München durchzuführen.

Bei **Prof. Dr. G. Stalla** möchte ich mich herzlich für die Vertretung dieser Doktorarbeit vor der Fakultät bedanken.

Dr. T. Rein danke ich sehr für die konstante kompetente und unterstützende Betreuung dieser Doktorarbeit.

Den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die stets kompetente wissenschaftliche Unterstützung und für die fruchtbaren Diskussionen im Rahmen der Durchführung der Experimente; insbesondere danke ich **Dr. J. Zschoke** für die Kategorisierung der fluoreszenzmikroskopischen Daten und **Dr. J. Rüegg** für die zahlreichen theoretischen und praktischen Hilfestellungen bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein Dank gilt **Dr. A. Yassouridis** für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der experimentellen Daten.

Meinen Eltern, insbesondere **meiner Mutter** danke ich von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung aber auch wissenschaftlichen Diskussionen, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsangabe

1. Einleitung	7
1.1 Rolle der Dysregulation der hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Achse (HPA-Achse) bei der Pathophysiologie der Depression	7
1.1.1 Hypothalamo-hypophyseo-adrenale Achse	8
1.1.2 Klinische Forschungsergebnisse	9
1.1.3 Mausmodelle	10
1.1.4 Präklinische Untersuchungsergebnisse	11
1.2 Molekularer Signalweg und Regulation des Glukokortikoidrezeptors	12
1.2.1 Kortikosteroidrezeptoren als Transkriptionsfaktoren	12
1.2.2 Der Heat shock protein 90 (Hsp90) – Heterochaperonkomplex	13
1.2.3 Chaperone	15
1.2.4 TPR-Proteine	15
1.2.5 Immunophiline	15
1.3 Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2 (XAP2)	16
1.4 Fragestellung	18
2. Methodischer Aufbau	19
2.1 Verwendetes Material	19
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	19
2.1.2 Kits und gebrauchsfertiges Material	20
2.1.3 Enzyme	20
2.1.4 Antikörper.....	21
2.1.5 Marker	21
2.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme	21
2.1.7 Oligonukleotide und Plasmide	22
2.1.8 Geräte	24
2.2 Angewendete Methoden	25
2.2.1 Präparation von DNA	25
2.2.2 Methoden zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2	27
2.2.3 Bakterienkultur	28
2.2.4 DNA-Präparation und Reinigung	29
2.2.5 Zellkultur	31
2.2.6 Transfektionsmethoden	32
2.2.7 Messung der Glukokortikoidrezeptoraktivität mittels Reporter-gen-Assay	34
2.2.8 Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.9 Fluoreszenzlokalisierung	40

3. Ergebnisse	42
3.1 Inhibierung der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2	42
3.1.1 Validierung der verwendeten Untersuchungsmethoden	42
3.1.2 Untersuchung der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter dem Einfluss von XAP2	44
3.1.3 Untersuchung des XAP2-Effektes in Abhängigkeit von Zelllinie und Transfektionsmethode	46
3.1.4 Untersuchung der Glukokortikoidrezeptorlevel unter XAP2	48
3.1.5 Einfluss veränderter Hormonkonzentrationen auf die XAP2-vermittelte Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit	52
3.2 Abhängigkeit der Inhibition des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 von der Interaktion mit hsp90.....	54
3.2.1 Nachweis einer XAP2-hsp90-Interaktion	54
3.2.2 Bedeutung der Interaktion mit hsp90 für die XAP2-vermittelte Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit	55
3.3 Einfluss von XAP2 auf die intrazelluläre Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors	60
4. Diskussion	64
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturverzeichnis	71
7. Abkürzungen	79
Anhang	80
Lebenslauf	92

1. Einleitung

1.1 Rolle der Dysregulation der hypothalamo-hypophyse-adrenalen Achse (HPA-Achse) bei der Pathophysiologie der Depression

Depressive Störungen gehören zur Gruppe der affektiven Erkrankungen und zählen zu den häufigsten psychiatrischen Krankheitsbildern. Kessler et al. (2003) z.B. geben die Lebenszeitprävalenz, d.h. die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer depressiven Störung zu erkranken, mit bis zu 15 Prozent an.

Zu den wichtigsten Symptomen der Depression gehören neben gedrückter Stimmung mit Freud- und Hoffnungslosigkeit oft auch eine Verminderung von Antrieb und Interessen sowie Schlaf- und Konzentrationsstörungen. Zudem können vielfältige vegetative Symptome und Vitalstörungen, aber auch Wahnideen und Suizidgedanken vorliegen. Im Verlauf betrachtet haben sowohl Definition und Darstellung depressiver Symptome und Erkrankungen wie auch die Erklärungsmodelle zur Ätiopathogenese derselben im historischen Rückblick einen großen Wandel erfahren: Während etwa die Ursache des im Corpus hippocraticum (5. Jh. v. Chr.) beschriebenen Phänomens der Melancholie (griechisch: μελαγχολία, „Schwarzgalligkeit“) zunächst in erster Linie im somatischen Bereich gesehen wurde, hielt das späte Mittelalter diesen schwermütigen Gemütszustand viel eher für ein dämonologisches Krankheitsbild (Möller, 2001). Ein weiteres Erklärungsmodell der Depression spiegelt sich in einem 1936 von Bumke herausgegebenen Lehrbuch der Psychiatrie wider, dessen Kapitel über affektive Erkrankungen mit den Worten beginnt: „In diesem Abschnitt sollen alle gemüthlichen Störungen besprochen werden, deren letzte Ursache in einer bestimmten ererbten Anlage, der pyknisch-thymopathischen Konstitution gelegen ist“ (Bumke, 1936).

Die Entwicklung der Antidepressiva zur Behandlung von depressiven Erkrankungen in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts sowie genauere Kenntnisse ihrer pharmakologischen Wirkmechanismen im Bereich der Neurotransmitter führten zu neuen, biologischen Erklärungsmodellen zur Ätiopathogenese der Depression, deren Schwerpunkt lange Zeit nahezu ausschließlich auf der sog. Monoaminomangelhypothese lag: Dieses Modell geht von einem Mangel an monoaminergen zentralen Neurotransmittern (u.a. Noradrenalin, Serotonin, Dopamin) im synaptischen Spalt als Ursache oder wesentliches pathophysiologisches Phänomen der Depression aus; medikamentös könne dieser Mangel durch eine Antidepressiva-vermittelte Hemmung der präsynaptischen Aufnahme oder des Abbaus der Monoamine mit konsekutiver Erhöhung der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt reguliert werden.

Mehrere unabhängige Veröffentlichungen rückten jedoch ein weiteres Regulationssystem in den Blickpunkt des Interesses der Depressionsforschung: So berichteten Nemeroff et al. (1984) über erhöhte Spiegel von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im Liquor cerebrospinalis depressiver Patienten. Rubin et al. (1987) wiesen zudem eine Erhöhung der Sekretionsimpulse von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Cortisol, begleitet von erhöhten Cortisolmengen im Urin dieser Patienten nach. Diese Ergebnisse knüpften an frühere Beobachtungen an: Bereits in den 60er Jahren hatten Gibbons et al. (1962) sowie Butler et al. (1968) bei depressiven Patienten über erhöhte basale Cortisolspiegel berichtet, welche sich nach medikamentöser Therapie normalisierten.

Das neuroendokrine Regulationssystem, das diese auffällig veränderten Parameter einschloss, wurde später als hypothalamo-hypophyse-adrenale Achse (HPA-Achse, Abb. 1) bezeichnet. Eine Dysregulation dieser Hormonachse stellte in der darauffolgenden Zeit einen der konsistentesten Befunde der biologischen Depressionsforschung dar. Eine umfassende Kenntnis der Funktions- und Regulationsmechanismen der HPA-Achse sowie ihrer

Bestandteile stellt daher eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Depression dar. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang dem Glukokortikoidrezeptor (GR) zu; dieser stellt einen wesentlichen Bestandteil der HPA-Achse dar und wird in seiner Funktion von einer Vielzahl weiterer Proteine beeinflusst. Die vollständige Zusammensetzung bzw. die genauen Funktionsmechanismen dieses GR-Regulationskomplexes sind jedoch noch nicht abschließend untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher erstmalig eine mögliche Rolle eines weiteren Proteins, des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 (XAP2) im humanen GR-Regulationskomplex untersucht.

Der einleitende Teil dieser Arbeit gliedert sich in mehrere Abschnitte. Es erfolgt zunächst die Darstellung von Ergebnissen verschiedener Forschungsbereiche, die Aufschluss über die Beteiligung der HPA-Achse, insbesondere des Glukokortikoidrezeptors an der Pathophysiologie der Depression geben; der zweite Abschnitt umfasst eine genauere Beschreibung des molekularen Signalweges des Glukokortikoidrezeptors; daran schließt sich eine Beschreibung des im Rahmen der Arbeit untersuchten Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 (XAP2) an.

1.1.1 Hypothalamo-hypophyséo-adrenale Achse

Als Hypothalamo-hypophyséo-adrenale Achse (HPA-Achse) wird die fein regulierte funktionelle Einheit von Hypothalamus, Hypophysenvorderlappen und Nebennierenrinde bezeichnet (Abb.1), die unter Stressbedingungen verstärkt aktiviert wird. Wie im Lehrbuch von Schmidt und Thews (1997) beschrieben, kommt es hierbei zunächst zur Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus. Die CRH-enthaltenden Neurone der paraventriculären Kerne des Hypothalamus (PNV) projizieren hierbei über den hypothalamisch-hypophysären Pfortaderkreislauf in den Hypophysenvorderlappen, wo es nach Bindung des Releasing-Hormons an CRH-Rezeptoren zur Sekretion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in den großen Kreislauf kommt. Unter ACTH-Einwirkung erfolgt in einem weiteren Schritt eine Stimulation der Freisetzung von Glukokortikoiden wie Cortisol aus der Nebennierenrinde. Diese binden an zwei Gruppen von Kortikosteroidrezeptoren (CR) – mit hoher Affinität an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) sowie mit niedrigerer Affinität an den Glukokortikoidrezeptor (GR). Die metabolische Wirkung der Glukokortikoide führt hierbei vor allem zu einer raschen Bereitstellung von Energie. Dies erfolgt u.a. durch Stimulation der Glukoneogenese, Steigerung der Lipolyse sowie eiweisskataboler Mechanismen. Zudem hemmen Glukokortikoide, vor allem in höheren Konzentrationen und über einen längeren Zeitraum, auch die zelluläre und humorale Immunabwehr.

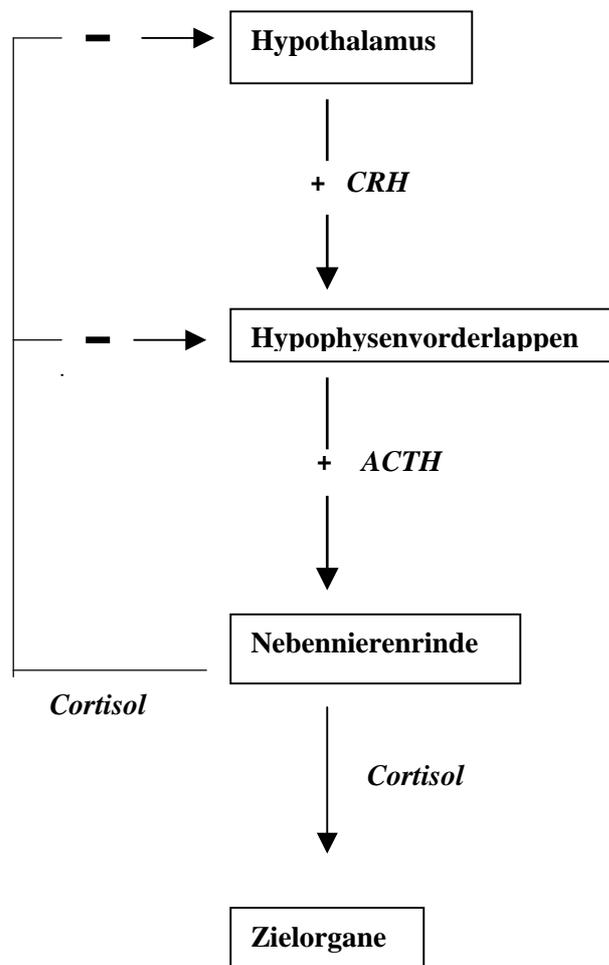


Abb. 1: Schematische Darstellung des hypothalamo-hypophyséo-adrenalen Regelkreislaufts (HPA-Achse)

1.1.2 Klinische Forschungsergebnisse

Eine Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse bei Patienten mit schwerer Depression stellt eines der konsistentesten Ergebnisse der biologischen Depressionsforschung dar. Hinweise auf eine Funktionsstörung in diesem Bereich zeigen sich hierbei in einer Vielzahl von Forschungsteilgebieten, z.B. den neuroendokrinen Tests, bei der Untersuchung von Mausmodellen sowie im Rahmen der präklinischen Forschung. Ergebnisse aus diesen Bereichen werden im Folgenden genauer dargestellt. Die neuroendokrinen Funktionstests sind in diesem Zusammenhang sicher einer der am besten untersuchten Teilbereiche:

Wie bereits erwähnt, wurden erhöhte Plasmacortisolspiegel bei Patienten, die an einer Depression erkrankt waren, bereits in den 60er Jahren beschrieben. Auch auf Grundlage

dieser Ergebnisse erfolgte die Entwicklung eines endokrinen Funktionstests bei depressiven Patienten, des Dexamethason-Hemmtests (DST) - dieser war ursprünglich im Rahmen der Diagnosefindung bei Patienten mit Cushing-Syndrom (Hypercortisolismus) eingesetzt worden: Nach einer Plasmacortisolbestimmung erhält der Proband am späten Abend eine geringe Menge (1-2 mg) Dexamethason (synth. Glucocorticoid hoher Potenz) oral. Am nächsten Tag erfolgt eine erneute, morgendliche Blutentnahme zur Plasmacortisolbestimmung. Dexamethason als potentes Glukokortikoid lässt hierbei im Sinne des oben beschriebenen Feedback-Mechanismus im Bereich der HPA-Achse sowohl eine reduzierte Ausschüttung von ACTH als auch von Cortisol erwarten. Carroll et al. berichteten jedoch 1968, dass eine große Anzahl bislang unbehandelter Patienten mit depressiven Störungen eine fehlende Supprimierbarkeit von Cortisol im Rahmen dieses Tests zeigen, was einen weiteren Hinweis auf eine Störung dieses Regulationssystems darstellte. Die Entdeckung von CRH und seine anschließende Verfügbarkeit im Rahmen endokriner Funktionstests führten zur Entwicklung weiterer komplexer neuroendokriner Tests, die genaueren Aufschluss über die Ursache der beobachteten Dysregulation bei einem Grossteil der depressiven Patienten geben sollte.

Bei dem von Holsboer et al. (1987) entwickelten kombinierten Dexamethason-CRH-Test etwa erfolgt nach dem bereits geschilderten Vorgehen auch die i.v - Gabe von CRH (100 µg) sowie ACTH- und Cortisolbestimmungen zu mehreren Zeitpunkten. Patienten, die an einer depressiven Störung litten, zeigten in diesem Test einen pathologischen Anstieg von Plasma-ACTH und -Cortisol nach der Dexamethasongabe sowie einen nochmaligen deutlichen Anstieg der Parameter nach der CRH-Gabe (von Bardeleben et al., 1991). Zobel et al. (1999) zeigten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen im Dex-CRH-Test klinisch remittierter depressiver Patienten und ihrem mittelfristigen weiteren Krankheitsverlauf: Patienten, die auffällig hohe Cortisolantworten im Test zeigten, wiesen im untersuchten Zeitraum der nächsten 6 Monate ein wesentlich erhöhtes Rückfallrisiko auf.

Eine Hyperaktivität der HPA-Achse mit erhöhter CRH-, ACTH- und Cortisolsekretion ist also eine zentrale Auffälligkeit bei der Untersuchung eines großen Teils depressiver Patienten. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch morphologische Untersuchungen: Rubin et al. (1995) z.B. berichteten bei untersuchten depressiven Patienten über eine Hypertrophie von Hypophyse und Nebennieren, die sich unter antidepressiver Therapie veränderbar zeigten.

Die Ursache dieser HPA-Achsenfunktionsstörung ist jedoch noch nicht vollständig bekannt. Eine naheliegende Erklärung ist jedoch eine mögliche Dysfunktion des Glukokortikoidrezeptors (Modell et al., 1997). In diesem Sinne könnte eine hinsichtlich endogener Glukokortikoide verminderte Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors, etwa über einen fehlenden adäquaten Feedback-Mechanismus zu einer Hyperaktivität der HPA-Achse mit erhöhter Sekretion der genannten Hormone führen. Dieses Modell wird auch als Corticosteroid-Rezeptor-Hypothese der Depression bezeichnet (Holsboer, 2000; Holsboer, 2001).

Im Folgenden werden Ergebnisse aus den Bereichen der Mausmodell- und präklinischen Forschung dargestellt, die ebenfalls Hinweise auf eine HPA-Achsenstörung insbesondere im Bereich des Glukokortikoidrezeptors geben.

1.1.3 Mausmodelle

Da aus naheliegenden Gründen weitergehenden Eingriffen sowohl im Bereich neuroendokriner Parameter wie auch der Untersuchung zentralnervöser Strukturen beim Menschen Grenzen gesetzt sind, repräsentieren sowohl die Verwendung von Mausmodellen als auch die in-vitro-Forschung wichtige Bereiche der Depressionsforschung. Ergebnisse aus diesen Bereichen, die weitere Hinweise auf Vorliegen und Art einer HPA-Achsen-Störung geben, sind u.a. folgende:

Da bisher kein dem humanen Krankheitsbild umfassend entsprechendes Abbild der Depression in der Maus vorliegt, werden Mausmodelle bislang zum größten Teil zur Untersuchung einzelner Aspekte bzw. zur Untersuchung der Interaktion verschiedener Regulationskreise verwendet. Eine wesentliche Rolle bei den Mausmodellen der Depression spielen Verhaltensbeobachtungen, z.B. das Auftreten von angst- bzw. depressionsähnlichem Verhalten in Stresssituationen.

Mausmodelle mit Mutationen im Bereich der HPA-Achse erstrecken sich u.a. auf die Bereiche CRH, CRH-Rezeptoren sowie den Glukokortikoidrezeptor. Knock-out-Mutationen auf der Ebene von CRH bzw. dem CRH-Rezeptor zeigten eher eine Hyporeaktivität des HPA-Systems bei Stress sowie weitgehend unverändertes oder reduziertes Angstverhalten bzw. führten zu uneindeutigen Ergebnissen in diesem Bereich (Muglia et al., 1995; Smith et al., 1998; Weninger et al., 1999; Bale et al., 2000; Coste et al., 2000; Jacobson et al., 2000; Kishimoto et al., 2000; Müller et al., 2000; Preil et al., 2001; Müller et al., 2006).

Mauslinien mit Veränderungen im Bereich des Glukokortikoidrezeptors zeigten ein anderes Bild: Heterozygote GR-knockout Mauslinien wiesen neben abnorm erhöhten Antworten im DEX/CRH-Test auch eine deutlich erhöhte Hilflosigkeit nach Stressexposition auf (Ridder et al., 2005; Müller et al., 2006). Mäuse, die eine postnatale Deletion des GR im Prosenzephalon und limbischen System besaßen, zeigten eine zunehmend steigende HPA-Aktivität sowie einen Anstieg depressionsähnlichen Verhaltens, was sich unter Langzeitbehandlung mit Imipramin reversibel zeigte (Boyle et al., 2005; Müller et al., 2006). Auch eine selektive Überexpression von GR in diesen Bereichen führte, bei jedoch unter basalen Bedingungen normaler HPA-Aktivität, zu einem Anstieg angstverwandten Verhaltens, welches durch die Gabe von Antidepressiva wie Desipramin oder Imipramin revertiert werden konnte (Wei et al., 2004; Müller et al., 2006). Auch diese Ergebnisse weisen daher auf die Bedeutung der HPA-Achse, vor allem aber auch die des Glukokortikoidrezeptors im Zusammenhang mit Symptomen affektiver Erkrankungen hin.

1.1.4 Präklinische Untersuchungsergebnisse

Ergebnisse präklinischer Untersuchungen, die eine Störung im Bereich der HPA-Achse insbesondere eine GR-Fehlfunktion wahrscheinlich scheinen lassen, erstrecken sich u.a. auf die durch Antidepressiva verschiedener pharmakologischer Klassen veränderten Parameter der HPA-Achse, wie etwa eine Erhöhung der Level des GR auf mRNA- und Proteinebene (Pepin et al., 1992; Reul et al., 1993). Calfa et al. (2003) wiederum berichteten von einer signifikant verringerten Menge an Glukokortikoidrezeptoren in peripheren Blutmonozyten bei einer Gruppe depressiver Patienten; dieser Aspekt zeigte sich unter medikamentöser antidepressiver Therapie - unabhängig vom pharmakologischen Wirkprofil - deutlich modifiziert. Eine Vielzahl anderer Untersuchungen fand jedoch keine Verringerung der GR-Zahl bei depressiven Patienten, vielmehr eine veränderte Funktion dieser Rezeptoren.

Da im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie Forschungsergebnisse, die Hinweise auf eine HPA-Achsenstörung und hierbei vor allem auf eine Glukokortikoidrezeptordysfunktion geben, dargestellt werden, soll an dieser Stelle nicht versäumt werden, auf weitere Erklärungsmodelle und Forschungsergebnisse im Rahmen der Depressionsforschung hinzuweisen – so etwa auf eine mögliche Bedeutung des Mineralokortikoidrezeptors im Rahmen der HPA-Achsendydysfunktion. Darüber hinaus sollen auch Hypothesen zur Rolle des monoaminergen Systems im Rahmen der Ätiopathogenese der Depression nicht unerwähnt bleiben. All diese Hypothesen stellen Modelle der sogenannten biologischen Psychiatrie dar. Daher soll an dieser Stelle ausdrücklich auch auf Depressionsmodelle aus den Bereichen der Psychologie/Psychoanalyse sowie Kognitions- und Lerntheorien hingewiesen

werden, die hier unberücksichtigt bleiben müssen. Eine detaillierte Beschreibung all dieser Modelle würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschreiten.

Auch soll nicht versäumt werden, darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse hinsichtlich einer Dysregulation der HPA-Achse die Frage danach, ob es sich bei den beobachteten Phänomenen um kausale Veränderungen im Rahmen von depressiven Erkrankungen oder um sog. Epiphänomene handelt, noch nicht endgültig beantworten können. Eine wesentliche Bedeutung bei der Beantwortung dieser Frage könnte genetischen Studien zukommen.

Wie gezeigt wurde, geben eine Vielzahl an Forschungsergebnissen starke Hinweise auf eine zentrale Rolle des Glukokortikoidrezeptors im Rahmen der Ätiopathogenese bzw. Pathophysiologie der Depression. Zum Verständnis einer möglichen pathophysiologischen Rolle des GR ist ein Kenntnis seines molekularen Signalweges sowie der Regulationsmechanismen, denen er unterliegt, essentiell. Der Stand der Forschung in diesem Bereich soll im Folgenden kurz erläutert werden.

1.2 Molekularer Signalweg und Regulation des Glukokortikoidrezeptors

Im folgenden Teil erfolgt eine Darstellung des molekularen Signalweges des Glukokortikoidrezeptors, wobei zunächst die an seiner Regulation beteiligten Faktoren behandelt werden.

1.2.1 Kortikosteroidrezeptoren als Transkriptionsfaktoren

Die Kortikosteroidrezeptoren (Glukokortikoidrezeptor, Mineralokortikoidrezeptor) gehören zur Familie der Steroidrezeptoren und damit zu den nukleären Rezeptoren und wirken als sog. ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Nach dem Eindringen der Steroidhormone in die Zelle mittels Diffusion binden diese an den im Zytosol in einem Heterokomplex (s. 1.2.2; 1.2.3) vorliegenden noch inaktiven Steroidrezeptor. Diese Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors hin zu einer höheren DNA-Bindungsaffinität. Nach der Hormonbindung erfolgen die Dissoziation des Heterokomplexes sowie seine Translokation in den Zellkern (Brinkmann, 1994). Bei einem weiteren wesentlichen Schritt in diesem Zyklus, der sog. Dimerisation des Rezeptors, ist noch nicht endgültig geklärt, ob er bereits im Zytosol oder erst im Kern der Zelle erfolgt. Im Nukleus bindet der Rezeptor an Enhancer-Sequenzen der DNA, die man auch als Hormon-responsive Elemente (Berg, 1989), im Falle des Glukokortikoidrezeptors als glukokortikoid-responsive Elemente, GREs bezeichnet. Hormon-responsive Elemente sind teilweise palindromische DNA-Sequenzen einer Länge von 12-18 Basenpaaren. Die Bindung des Rezeptors an die Enhancer-Sequenz kann zur Transaktivierung (Induktion der Transkription) oder Transrepression (Reduktion der Transkription) der entsprechenden Gene führen. Transaktivierung bzw. Transrepression erfolgen durch Interaktion des Rezeptors mit weiteren Cofaktoren (Coaktivatoren bzw. Corepressoren), beispielsweise durch Interaktion mit Bestandteilen des Transkriptionsinitiationskomplexes (Beato et al., 1989; Wahli et al., 1991; Brinkmann, 1994). Offenbar stellen auch Acetylierung von Histonen und damit Destabilisierung des Chromatins bzw. Histondeacetylierung, d.h. Stabilisierung des Chromatins, wichtige Funktionen der oben genannten Cofaktoren in diesem Zusammenhang dar (Collingwood et al., 1999).

Strukturell weisen die Kortikosteroidrezeptoren verschiedene funktionelle Domänen auf – hierin besteht große Homologie zu den anderen Steroidrezeptoren. So zeigen sie

beispielsweise in der N-terminalen Region eine Domäne für die Transkriptionsregulation (Giguere et al., 1986; Hollenberg et al., 1987; Almlöf et al., 1998). Zentral gelegen findet sich die hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche die Bindung des Rezeptors an die entsprechenden Enhancer-Sequenzen vermittelt. Die C-terminale Region beherbergt die Ligandenbindungsdomäne (LBD), diese enthält zusätzlich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches an der Translokation des Rezeptors in den Kern beteiligt ist (Tsai et al., 1994).

Glukokortikoidrezeptoren sind also ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die im inaktiven Zustand in grossen Heterokomplexen vorliegen und durch diese reguliert werden. Einige dieser am Heterokomplex beteiligten Faktoren sind TPR (Tetratricopeptide-repeat) - Proteine und Immunophiline. Für einige Vertreter dieser Gruppen wie FKBP51 und 52 konnten bereits spezifische Effekte auf die Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors gezeigt werden (Riggs et al., 2003; Wochnik et al., 2005).

1.2.2 Der Heat shock protein 90 (Hsp90) - Heterochaperonkomplex

Wie bereits erwähnt, liegen die Kortikosteroidrezeptoren wie viele nukleäre Rezeptoren in großen Heterokomplexen vor, die neben weiteren Interaktionspartnern auch heat shock Proteine enthalten. Heat shock Proteine erhielten ihren Namen ausgehend von der Beobachtung, dass sie unter Bedingungen zellulären Stresses, z.B. Hitze, eine starke Hochregulation erfahren – heat shock Proteine sind aber auch unter normalen Wachstumsbedingungen der Zelle von essentieller Bedeutung (Agashe et al., 2000).

Ein Vertreter und wichtiger Bestandteil der oben genannten Heterokomplexe ist das heat shock Protein 90 (hsp90). Hsp90 ist dabei nicht nur ein im Verlauf der Evolution stark konserviertes (Bose et al., 1996), sondern auch eines der häufigsten Proteine in eukaryonten Zellen. Sein Anteil kann bereits unter normalen zellulären Bedingungen bis zu 1% der Gesamtmenge an löslichen Proteinen betragen (Welch et al., 1982) – unter Stress kann die Hsp90-Expression jedoch noch weiter ansteigen (Buchner, 1999).

Hsp90 ist wesentlich an der Faltung von Steroidrezeptoren, so auch des Glukokortikoidrezeptors, beteiligt - ein Vorgang, der energieabhängig in mehreren Schritten und unter Beteiligung zahlreicher weiterer Faktoren erfolgt. Dies soll im Folgenden am Beispiel des Glukokortikoidrezeptors näher beschrieben werden (Abb.2):

Man geht allgemein davon aus, dass in einem ersten Schritt zunächst die Bindung des ATP-gebundenen heat shock proteins 70 (hsp70) an den freien Rezeptor erfolgt. Die durch ein weiteres heat shock protein, hsp40, vermittelte anschließende ATP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung des nun ADP-gebundenen hsp70 und dies schliesslich zu einer ersten Konformationsänderung der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors (Morishima et al., 2000). Nach dem Eintritt von Hop (Hsp organisierendes Protein) in den Heterokomplex (Scheufler et al., 2000) erfolgt in einem weiteren Schritt die Bindung ATP-gebundenen hsp90s an die Ligandenbindungsdomäne des Glukokortikoidrezeptors (Pratt et al., 1997). Die sich nun anschließende Hydrolyse des hsp90-gebundenen ATPs stellt offenbar eine wesentliche Voraussetzung für die Öffnung der Hormonbindungstasche des Rezeptors und damit eine hohe Ligandenbindungsaffinität, d.h. Hormonbindungsaffinität des Rezeptors dar (Grenert et al., 1999; Morishima et al., 2000). Die Heterokomplexe können - neben den bereits genannten - auch noch weitere Interaktionspartner enthalten. Bekannte Interaktionspartner von hsp90 in diesem Zusammenhang sind in Tabelle 1 dargestellt.

Bezeichnung	Charakterisierung
Cyp40	<i>TPR-Protein, Immunophilin, Chaperon</i>
FKBP51	<i>TPR-Protein, Immunophilin, Chaperon</i>
FKBP52	<i>TPR-Protein, Immunophilin, Chaperon</i>
HiP	Cofaktor von Hsp70
Hop	<i>TPR-Protein, Assemblierungsfaktor von hsp90/hsp70</i>
Hsp40	Cofaktor von Hsp70
Hsp70	Chaperon
P23	Chaperon <i>und Cochaperon</i>
PP5	Serin-Phosphatase, <i>TPR-Protein</i>
XAP2	<i>TPR-Protein, Immunophilin-Homologon</i>

Tabelle 1: Übersicht über hsp90-Partner-Proteine

Nach Buchner (1999), zusätzlich eingefügte Informationen wurden kursiv gekennzeichnet.

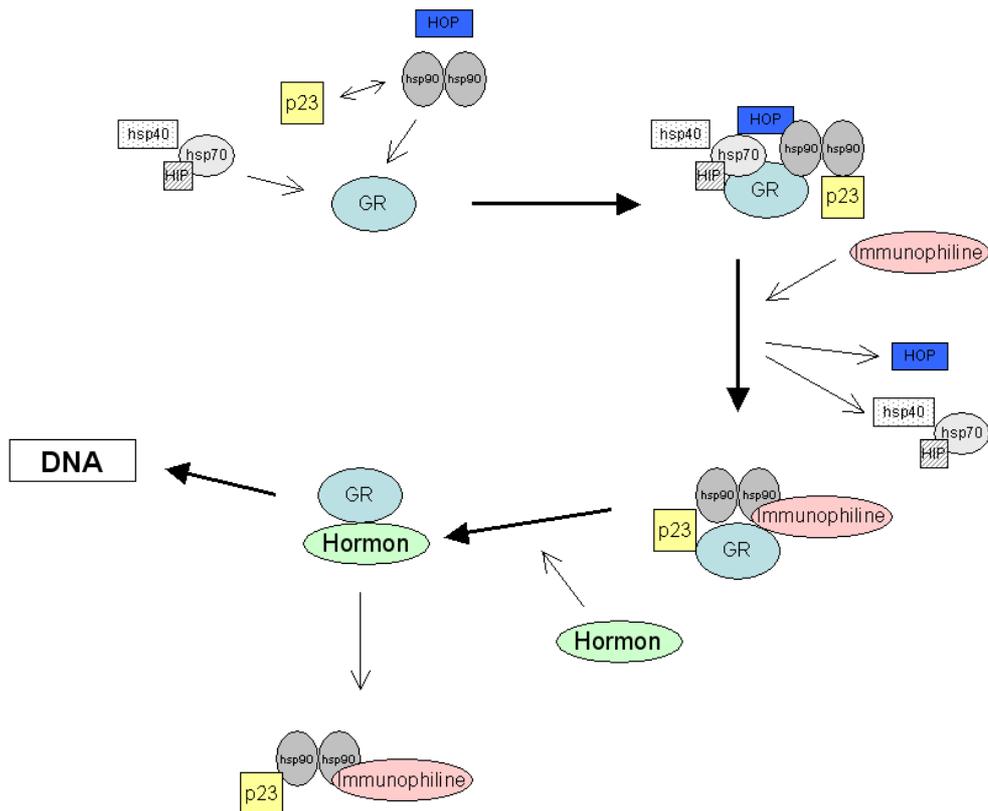


Abb. 2: Schematische Darstellung des GR-hsp90-Heterochaperonzyklus
Modifiziert nach Buchner (1999)

1.2.3 Chaperone

Die lange Zeit gültige Lehrmeinung hinsichtlich der Faltungsvorgänge von Proteinen ging davon aus, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins ausschließlich durch seine Primärstruktur, d.h. seine Aminosäuresequenz bestimmt sei und die Faltung von Proteinen einen spontanen und energieunabhängigen Prozess darstelle (Anfinsen, 1973). Dieses Paradigma wurde durch die Entdeckung der sog. „chaperone“ revolutioniert. Chaperone sind Proteine, die direkt am Faltungsvorgang anderer Proteine beteiligt sind; der Begriff „chaperon“ (frz./engl.: Anstands dame) war ursprünglich für die Eigenschaft des Kernproteins Nucleoplasmin, unerwünschte Interaktionen zwischen Histonen und DNA zu verhindern und dadurch die Chromatinvereinigung zu erleichtern, verwendet worden (Laskey et al., 1978).

In der Tat erfolgt die Faltung der meisten Proteine in der Zelle unter Beteiligung eines oder mehrerer Chaperone (Fink, 1999). Die bisher bekannten Funktionen der Chaperone sind vielfältig; sie binden beispielsweise an neusynthetisierte Polypeptidketten sowie teilweise gefaltete intermediäre Proteine und verhindern deren Aggregation und Fehlfaltung sowie unerwünschte Interaktionen mit anderen zellulären Komponenten. Chaperone regulieren jedoch auch die Bildung von Multiproteinkomplexen (Fink, 1999). Wichtige Vertreter der Familie der Chaperone sind hsp40, hsp60, hsp70, hsp90 sowie die Familien der kleinen heat shock proteine und Chaperonine (Fink, 1999; Agashe et al., 2000).

Unter den Bedingungen der Zelle agieren Chaperone aber selten alleine, vielmehr meist zusammen mit sog. Cochaperonen und weiteren Cofaktoren (Hendrick et al., 1993; Agashe et al., 2000).

Ein Protein, dessen korrekte Faltung wesentlich von der Regulation durch Chaperone und weiteren Cofaktoren bestimmt wird, ist der Glukokortikoidrezeptor (GR) (Brinkmann, 1994). Die Untersuchung der an diesen Komplexen teilnehmenden Faktoren ist jedoch noch nicht abgeschlossen.

1.2.4 TPR-Proteine

Viele der hsp90-Partnerproteine sind sog. TPR-Proteine; einige davon haben zusätzliche Domänen, so z.B. FKBP51 und 52, welche gleichzeitig auch der Gruppe der Immunophiline zuzurechnen sind.

Als TPR-Proteine werden Proteine bezeichnet, die eine oder mehrere sog. TPR (Tetratricopeptid-repeat)-Domänen aufweisen (Chen et al., 1998). Eine TPR-Domäne besteht aus 34 Aminosäuren umfassenden, sich wiederholenden Elementen; einige charakteristische Aminosäuren dieser Domänen zeigen sich hierbei innerhalb der Gruppe der TPR-Proteine konserviert. Die TPR-Domäne spielt eine wesentliche Rolle bei Interaktionen mit anderen Proteinen (Scheufler et al., 2000) – so ist beispielsweise hsp90 ein wichtiger Bindungspartner für Proteine mit TPR-Domäne. Die Bindung erfolgt hierbei über den C-terminalen Teil von hsp90. Wichtige Vertreter der Gruppe der TPR-Proteine sind u.a.: Hop, Chip, FKBP51, FKBP52, Cyp40, PP5 sowie das, in dieser Arbeit näher untersuchte XAP2.

1.2.5 Immunophiline

Als Immunophiline werden Proteine bezeichnet, die eine sogenannte Immunophilindomäne aufweisen (Marks et al., 1996). Sie beziehen ihre Namen aus ihrer Eigenschaft, bestimmte Immunsuppressiva zu binden (Marks et al., 1996). Bei Bindung von FK506 heißen diese FKBP, bei der Bindung von Cyclosporin A Cyclophiline.

Bei vielen Immunophilinen hat diese Domäne eine cis-trans-peptidyl-prolyl-isomerase-Aktivität und ist das Ziel für die Bindung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin, FK506

oder Rapamycin. Unter *in vitro*-Bedingungen kann Prolin-cis-trans-Isomerisierung ein limitierender Schritt bei der Proteinfaltung sein; in vielen Fällen hebt die Anwesenheit einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase) die Faltungsrate an (Fink, 1999). Proteine mit Peptidyl-prolyl-Isomeraseaktivität werden in drei Subklassen unterteilt: Cyclophiline, FK506-bindenden Proteine (FKBP) und Parvuline (Fink, 1999; Schmid, 1998). Die ersten beiden Gruppen werden auch als Immunophiline bezeichnet. Die Bindung der Immunsuppressiva führt zur Hemmung der PPIase-Aktivität. Beispiele für Immunophiline sind FKBP51 und 52. Beide Proteine sind Bestandteil des GR-hsp90-Cochaperonkomplexes und nehmen Einfluss auf die Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors.

Die weitreichende Bedeutung der Immunophiline bzw. TPR-Proteine für die Funktion der Steroidrezeptoren konnte im Tiermodell bereits auf eindrückliche Weise gezeigt werden: So erwiesen sich etwa weibliche FKBP52-defiziente Mäuse als unfruchtbar (Yang et al., 2006).

1.3 Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2 (XAP2)

Das Hepatitis B Virus X-assoziierte Protein 2 (XAP2), auch als AhR-interagierendes Protein (AIP), AhR-assoziiertes Protein 9 (ARA9) oder FKBP37 bezeichnet, wurde erstmals als Interaktionspartner und Inhibitor des Hepatitis B Virus X-Proteins identifiziert (Kuzhandaivelu et al., 1996). Wenig später wurde über eine Beteiligung des Proteins am Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR)-hsp90-Komplex sowohl im Hefesystem als auch in Säugetierzellen berichtet (Carver et al., 1997; Ma et al., 1997; Meyer et al., 1998).

XAP2 ist ein 37 kDa-Protein, bei dem zunächst eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation beobachtet wurde (Ma et al., 1997). Untersuchungen hinsichtlich einer Gewebespezifität zeigten eine Expression von XAP2 in allen untersuchten humanen Geweben, auch dem ZNS. Eine besonders starke Expression fand sich in Herz, Placenta, Skelettmuskulatur, Milz, Lymphknoten, Thymus, Appendix und peripheren Blutleukozyten (Kuzhandaivelu, 1996; Carver et al., 1997).

Strukturell zeigt XAP2 (Abb.3) eine deutliche Homologie zu Vertretern der Immunophiline und TPR-Proteine, die größte Übereinstimmung besteht hierbei zu dem bereits erwähnten FKBP52. N-terminal weist XAP2 dabei eine Aminosäuresequenzübereinstimmung mit der ebenfalls N-terminal lokalisierten Domäne von FKBP52 auf, welche bei letztgenanntem Protein auch die PPIase-Aktivität sowie FK506-Bindung beherbergt. Die sich anschließende XAP2-Region zeigt größere Homologie zu FKBP12 (Carver et al., 1997). Im Bereich des C-Terminus finden sich bei XAP2 drei TPR-Domänen, die unterschiedlich große Übereinstimmung mit den TPR-Domänen von FKBP52 zeigen (Carver et al., 1997). Die Funktion der letzten fünf Aminosäuren, die auch als distale C-terminale Region (DCR) bezeichnet wird, ist noch nicht abschließend geklärt, es wurden sowohl eine direkte Interaktion dieser Region mit dem AhR als auch mit hsp90 diskutiert (Meyer et al., 1999; Bell et al., 2000; Kazlauskas et al., 2002).

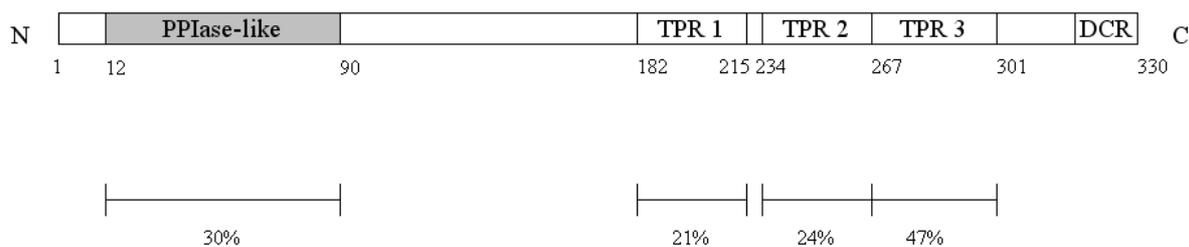


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von XAP2

Modifiziert nach Carver et al. (1997), van der Spuy et al. (2004). PPIase = Peptidyl Prolyl Isomerase; TPR = Tetratricopeptid-repeat; DCR = distale C-terminale Region
Die Prozentangaben beziehen sich auf die strukturelle Übereinstimmung mit FKBP52

Aufgrund seiner TPR-Domänen ist XAP2 also - wie auch FKBP51 und FKBP52 - zu den TPR-Proteinen zu zählen. Eine FK506-Bindung von XAP2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Carver et al., 1998). Aus diesem Grund wird XAP2 auch nicht als Immunophilin, sondern als immunophilin-ähnlich oder immunophilin-homolog bezeichnet. Ausgehend von der fehlenden FK506-Bindung sowie der nicht sehr stark ausgeprägten Sequenzhomologie der „PPIase-like“-Domäne von XAP2 im Bereich des N-Terminus mit den PPIase-Domänen der Immunophiline erscheint eine PPIase-Aktivität von XAP2 nicht sehr wahrscheinlich. Eine Messung dieser Aktivität bei XAP2 wurde jedoch bisher zur abschließenden Klärung dieses Sachverhaltes noch nicht durchgeführt. Die Frage nach einer PPIase-Funktion von XAP2 kann daher noch nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden.

Die bislang zur Funktion von XAP2 veröffentlichten Forschungsergebnisse behandeln weit überwiegend die Rolle des Proteins im Zusammenhang mit dem Aryl Hydrocarbon Rezeptor, der wie der Glukokortikoidrezeptor als nukleärer Rezeptor und damit als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor agiert. In diesem Zusammenhang wurde mehrfach über eine XAP2-induzierte Erhöhung der ligandenaktivierten Transkriptionsaktivität des AhR in Hefe bzw. Säugetierzellen berichtet (Ma et al., 1997; Carver et al., 1998; Meyer et al., 1998; Lees et al., 2003). Andere Autoren beobachteten jedoch eine XAP2-vermittelte Inhibition der AhR-Aktivität bzw. berichteten über differierende Ergebnisse in verschiedenen Zelllinien/Organismen und experimentellen Methoden (Petrulis et al., 2003; Hollingshead, 2004; Ramadoss et al., 2004; Pollenz et al., 2005).

Auf Proteinebene induziert XAP2 die Stabilisierung der Ah-Rezeptorlevel (Meyer et al., 1999; Meyer et al., 2000; LaPres et al., 2000; Lees et al., 2003).

Als eine mögliche Ursache für die in Anwesenheit von XAP2 erhöhten Rezeptorproteinlevels wurde eine Reduktion des Rezeptorabbaus diskutiert. So berichteten Kazlauskas et al. (2000) über eine in Anwesenheit von XAP2 konzentrationsabhängige deutliche Reduzierung ubiquitiniertes AhR-Level sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit eines Liganden (zum Abbau im Proteasomenkomplex vorgesehene Proteine werden in einem ersten Schritt zunächst mittels Ubiquitinierung markiert). Eine mögliche Beteiligung von CHIP am Abbauprozess des AhR sowie eine möglicher XAP2-Einfluss hierauf wurden bisher kontrovers diskutiert (Lees et al., 2002, Lees et al., 2003; Pollenz et al., 2005).

Eine weiterer Aspekt ist der XAP2-vermittelte Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des AhR. Der Ah-Rezeptor zeigt bei gleichzeitiger Expression von XAP2 sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit des Liganden eine deutlich stärkere zytoplasmatische Lokalisation (Kazlauskas et al., 2000; Petrulis et al., 2000).

Neben der Rolle von XAP2 im Zusammenhang mit dem AhR zeigen neuere Veröffentlichungen auch XAP2-Interaktionen mit anderen Rezeptoren, z.B. eine Interaktion mit bzw. eine Inhibierung des Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptors α (PPAR α). Dieser stellt einen nukleären Rezeptor dar, der im humanen System eine Funktion im Rahmen der Energiehomöostase durch eine Kontrolle des Lipidmetabolismus aufweist (Sumanasekera et al., 2003). Zudem konnte eine spezifische Interaktion von XAP2 mit cyclischer AMP-spezifischer Phosphodiesterase 4 (PDE4) in Hefe gezeigt werden (Bolger et al., 2003), ebenso wie eine Interaktion zwischen XAP2 und EBNA-3 (Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 3) Protein, das eines der von Epstein-Barr-Virus kodierten Antigene darstellt (Kashuba et al., 2000).

Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Interaktion von XAP2 mit dem Glukokortikoidrezeptor liegen bisher lediglich im Hefesystem vor; hier konnte kein Einfluss von XAP2 auf die GR-Aktivität beobachtet werden (Carver et al., 1998).

1.4 Fragestellung

Trotz zahlreicher Untersuchungen, die auf eine zentrale Rolle einer Dysregulation der HPA-Achse bei der Ätiopathogenese der Depression hinweisen, ist der diesem Phänomen zugrundeliegende Mechanismus bisher noch nicht ausreichend geklärt. Wesentliche Voraussetzung für das Verständnis eines solchen Pathomechanismus ist jedoch zunächst eine noch genauere Kenntnis der Regulations- und Funktionsmechanismen des komplexen Systems des hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Regelkreislaufes und hierbei besonders des Glukokortikoidrezeptors.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich beim Glukokortikoidrezeptor um einen nukleären Rezeptor, dessen Funktion durch eine Vielzahl anderer Proteine reguliert wird, wobei viele dieser Cofaktoren zur Familie der TPR-Proteine gehören. Das Hepatitis B Virus X-assoziierte Protein 2 (XAP2) stellt einen bisher noch nicht umfassend wissenschaftlich untersuchten Vertreter dieser Familie mit großer struktureller Homologie zu bereits bekannten GR-Regulationsfaktoren dar.

Diese Arbeit untersucht die Frage, ob und in welcher Funktion XAP2 am humanen GR-hsp90-Heterokomplex beteiligt ist. Hierzu wurde unter Verwendung der Methode der Transfektion in verschiedenen eukaryonten Zelllinien ein Meßsystem zur Bestimmung eines möglichen Einflusses von XAP2 auf die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoidrezeptors etabliert. In einem weiteren Schritt wurden die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen des beobachteten XAP2-Effektes u.a. mittels proteinbiochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Verfahren untersucht.

Die vorliegende Arbeit möchte hiermit einen Beitrag zur genaueren Kenntnis der Regulation des Glukokortikoidrezeptors bzw. des hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Regelkreislaufes und damit zur Pathophysiologie affektiver Erkrankungen leisten.

2. Methodischer Aufbau

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes von XAP2 auf den Glukokortikoidrezeptor wurde dessen Funktion in Anwesenheit von XAP2 bzw. Kontrollproteinen in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Hierzu wurde zunächst die in vielen Laboratorien verwendete Methode der Transfektion verwendet. Hierbei werden Plasmide (ringförmige DNA), welche je nach Untersuchungsaufbau für XAP2, den Glukokortikoidrezeptor oder für Proteine zur späteren Funktionsmessung o.ä. kodierten, mittels elektrischer oder chemischer Methoden in die zu untersuchenden Zellen eingeschleust. Die eingebrachten Plasmide werden durch die Zellen mittels Transkription und Translation in die entsprechenden Proteine übersetzt. Um später die Funktion, d.h. die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors bei Gabe von Liganden (Hormon) messen zu können, wurden im Anschluss an die Transfektion jeweils identische Untersuchungsansätze (d.h. Untersuchungsansätze mit der gleichen Menge an transfiziertem Cofaktor) jeweils einmal mit Hormon (Glukokortikoiden) und einmal ohne Hormon, d.h. mit Vehikel (Ethanol) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgten die Lyse der Zellen und die Messung der Aktivität des Glukokortikoidrezeptors mittels der Methode der sog. Reporterassays (Firefly-Luciferase, Galaktosidase, Gaussia-Luciferase). Hierbei diente die Bestimmung der Firefly-Luciferase der Messung der Rezeptoraktivität; die Bestimmung der β -Galaktosidase bzw. Gaussia-Luciferase wurde zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz durchgeführt (s. 2.2.7).

Die Level der auf den transfizierten Plasmiden kodierten Proteine in den Zellen wurden in den Lysaten, die auch der Funktionsuntersuchungen dienten, mit der sog. Westernblotanalyse nachgewiesen.

Die sich im Folgenden ergebende Frage nach der Bindung bzw. Bindungsstärke von XAP2 bzw. der anderen untersuchten Proteinen an den Glukokortikoidrezeptor wurde mittels Co-Immunopräzipitation ebenfalls nach Transfektion und Lyse humaner Zelllinien untersucht. In einem weiteren Schritt erfolgte die intrazelluläre Lokalisation des GR in Anwesenheit/Abwesenheit von XAP2 mittels Fluoreszenzlokalisierung.

2.1. Verwendetes Material

In diesem Punkt erfolgt zunächst eine Auflistung des im Rahmen der durchgeführten Experimente verwendeten Materials. Die verwendeten experimentellen Methoden werden unter 2.2 näher beschrieben.

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamidlösung (37,5% mit 1% Bisacrylamid)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Adenosin-5'-Triphosphat	Sigma (St. Louis, USA)
Agarose SeaKem	Biozym (Oldendorf)
Aktivkohle	Sigma (St. Louis, USA)
100x Antibiotic-Antimycotic	Invitrogen (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	Sigma (St. Louis, USA)
Cortisol (17-Hydroxycorticosteron)	Sigma (St. Louis, USA)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Dexamethason	Sigma (St. Louis, USA)

Dextran T70	Sigma (St. Louis, USA)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
DTT (1,4-Dithiotreit)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Medium w/o Phenol red	Invitrogen (Karlsruhe)
10x EBSS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Sigma (St. Louis, USA)
Einbettmedium Pro taps Mount Fluor Quartett	Immundiagnostika (Berlin)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs)
Foetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gelantine	Sigma (St. Louis, USA)
Hefe-Extrakt	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Kodak GBX Developer	Sigma (St. Louis, USA)
Kodak GBX Fixer	Sigma (St. Louis, USA)
LB Broth	Sigma (St. Louis, USA)
Luciferin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Milchpulver Rapidlait	Migros (Schweiz)
10x PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma (St. Louis, USA)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Fluka (Buchs)
100 mM Sodium Pyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Bio-Rad (München)
Tris	Riedel-de Haen (Seelze)
Triton X-100	Sigma (St. Louis, USA)
10x Trypsin-EDTA Solution	Invitrogen (Karlsruhe)
TWEEN20	Sigma (St. Louis, USA)

Chemikalien, die sich nicht in dieser Aufzählung wiederfinden, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Kits und gebrauchsfertiges Material

BCA-Kit	Amersham (Freiburg)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
ECL-Westernblot-Detektionssystem	Amersham (Freiburg)
Exgen 500	MBI Fermentas (St. Louis, USA)
M2-FLAG beads	Sigma (St- Louis, USA)
Nucleobond AX 2000 Kit	Machery-Nagel (Düren)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)

2.1.3 Enzyme

Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Pwo- DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt a. M.)

Dpn I Restriktionsendonuklease
 Taq-DNA-Polymerase
 T4-DNA-Ligase

Stratagene (La Jolla, USA)
 Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
 Peqlab Biotechnologie (Erlangen)

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Aktin I-19	1: 2000	goat IgG	Santa Cruz Biotechnology (S. Cruz, USA)
Anti-FLAG M2	1: 2000	mouse IgG1	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-Hsp90 H-114	1: 2000	rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology (S. Cruz, USA)

Sekundäre, peroxidasegekoppelte Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Wirtstier	Bezugsquelle
Anti-Goat IgG	1: 2000	Esel	Santa Cruz Biotechnology (S. Cruz, USA)
Anti-Mouse IgG	1: 2000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-Rabbit IgG	1: 2000	Ziege	Sigma (St. Lois, USA)

2.1.5 Marker

DNA-Leiter-Mix	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Kaleidoskop prestained Standards	Bio-Rad Laboratories (München)
Lamda-DNA HindIII Digest	NEB (Frankfurt a.M.)
PeqGOLD Protein Marker IV	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
PhiX174 DNA-HaeIII Digest	NEB (Frankfurt a. M.)

2.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinien

Bezeichnung	ATCC	Charakterisierung
HEK 293	CCL 1573	humane Nierenzellen
HeLa	CCL2	humane Tumorzelllinie
Sk-N-MC	HTB10	humane Neuroblastom-Zelllinie

Bakterienstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
DH5 α (E. coli)	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.7 Oligonukleotide und Plasmide

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendung
XAP2TPRmut1	TTG GAA TTC ATG GCG GAT ATC ATC GCA	Upstream Primer für die Klonierung von XAP2TPRmut
XAP2TPRmut2	AGC GAA GTA GGC TGC GAC GTT GTC GTC GTA CTT G	Downstream Primer für die Klonierung von XAP2TPRmut
XAP2TPRmut3	GTC GCA GCC TAC TTC GCT CGG GGC AAG GCC CCA C	Klonierung von XAP2TPRmut
XAP2TPRmut4	TTG AAG CTT CAA TGG GAG AAG ATC CC	Klonierung von XAP2TPRmut
XAP2-Mut_for-primer	CGACGACAAC GTCGCAGCCT ACTTCGCTCG GGCAAGGCC CAC	Klonierung von XAP2TPRmutflag
XAP2-Mut_rev-primer	GTGGGCCTTG CCCCGAGCGA AGTAGGCTGC GACGTTGTCG TCG	Klonierung von XAP2TPRmutflag
XAP2seq1	CCT GCT GGT ACG TGC C	Sequenzierung von XAP2-Plasmiden
XAP2seq2	GGA GAT GCT GAA GGT GG	Sequenzierung von XAP2-Plasmiden
XAP2seq3	GCT GGG TCC AGC TCC AG	Sequenzierung von XAP2-Plasmiden
XAP2seq4	CCA TGG GCT TGC CAC G	Sequenzierung von XAP2-Plasmiden

Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pRK5-SV40PUR	Expressionsvektor für Säugetierzellen, humaner Cytomegalievirus (CMV)-Promotor, Puromycin- und Ampicillinresistenz	Spengler et al., 1993
pRK5-SV40MCS	Expressionsvektor für Säugetierzellen, CMV-Promotor, Puromycin- und Ampicillinresistenz, multiple Klonierungsstelle	Wochnik et al., 2005
MTV-Luc	Luciferasereportergen mit MMTV (mouse mammary)	Hollenberg et al., 1988

	tumor virus)-Promoter, induzierbar durch GR, MR, PR, AR, Ampicillinresistenz	
pCMV-β-Gal	β-Galactosidase, CMV- Promotor, Ampicillinresistenz	Stratagene (La Jolla, USA)
PCMV-Gluc-1	Gaussia-Luciferase, CMV- Promotor	PJK GmbH (Kleinblittersdorf)
pRK7-GR	Humaner GR, SV 40 Promotor, Ampicillinresistenz	Erhalten von D. Spengler
pRK7-GR-FLAG	Humaner GR, SV 40 Promotor, Ampicillinresistenz, N- terminales FLAG-Epitop	Wochnik et al., 2005
GFP-GR	Humaner GR, CMV- Promotor, Kanamycinresistenz, N- terminal mit GFP fusioniert	Wochnik et al., 2005
PCI-XAP2	XAP2, CMV-Promotor, Ampicillinresistenz	Erhalten von I. Pongratz Kazlauskas et al., 2000/2001
PCI-XAP2-FLAG	XAP2, CMV-Promotor, Ampicillinresistenz, C- terminales FLAG-Epitop	Erhalten von I. Pongratz Kazlauskas et al., 2000/2001
pRK5-Xap2TPRmut	XAP2 mit mutierter TPR- Domäne	
PCI-Xap2 TPRmut-FLAG	XAP2 mit mutierter TPR- Domäne, C- terminales FLAG-Epitop	
pRK5-FKBP51-FLAG	FKBP51, CMV-Promotor, Ampicillinresistenz, C- terminales FLAG-Epitop	Wochnik et al., 2005
pRK5-FKBP52-FLAG	FKBP52, CMV-Promotor, Ampicillinresistenz, fusioniert mit C-terminalem FLAG	Wochnik et al., 2005
PRK5-FKBP51TPR-FLAG	FKBP51 mit mutierter TPR- Domäne, C-terminales FLAG-Epitop	Wochnik et al., 2005

2.1.8 Geräte

Allegra 21 Zentrifuge	Beckmann (Krefeld)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Mannheim)
Bodenzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophoresezubehör	Bio-Rad (München)
Feinwaage Voyager 50228	Ohaus (Giessen)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Jena)
Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Horizontaler Gelträger Agarosegele	Bio-Rad (München)
Imaging System 440	Kodak (USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Mannheim)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Microplattenreader MR 7000	Dynatech (Denkendorf)
Mikroskop CK30	Olympus (Hamburg)
Omifuge 2.0 RS	Heraeus (Mannheim)
PCR-Gerät DNA Engine PTC-200	Biozym (Oldendorf)
PH-Meter	WTW (Weilheim)
Power-Pac 200	Bio-Rad (München)
Reinstwasseranlage PureLab ultra	Labtech (Wohlen)
Rotamix Überkopfschüttler	ELMI (Lettland)
Schüttler Vibrax	IKA Labortechnik (Staufen)
Shaker S4	ELMI (Lettland)
Spektrophotometer DU 640	Beckmann (Krefeld)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Mannheim)
UV-Transilluminator	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Victor2 Multilabel Counter	Wallac (Finnland)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage Voyager 50187	Ohaus (Giessen)
Wasserbad	Gesellschaft f. Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifuge J2 MC Rotor JA-14	Beckmann (Krefeld)

2.2 Angewendete Methoden

2.2.1 Präparation von DNA

Die im Rahmen der Transfektion in die Zellen eingebrachten Plasmide, insbesondere die für XAP2 und dessen Mutationen kodierenden, mussten teilweise selbst hergestellt bzw. den Untersuchungsbedingungen entsprechend modifiziert werden. Hierzu dienten die im Folgenden beschriebenen Methoden der Präparation von DNA.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels der Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion können nahezu beliebige DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Hierzu werden dem Reaktionsansatz neben der Ausgangs-DNA, dem entsprechenden Puffer, Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) und einer thermostabilen DNA-Polymerase auch spezifisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) zugegeben. Die beiden Oligonukleotide sind hierbei so gestaltet, dass sie jeweils der Sequenz an den beiden 5'-Enden der DNA-Einzelstränge des zu amplifizierenden Abschnittes komplementär sind, d.h. den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt gewissermaßen umrahmen. In einem ersten Schritt wird durch Erhitzen der Ausgangs-DNA über 90°C eine Denaturierung, d.h. die Auftrennung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge erreicht. Beim nachfolgenden Abkühlen kommt es zur Bindung der Oligonukleotide an die entsprechend komplementäre Sequenz des Einzelstranges. Dieser Vorgang wird auch als „Annealing“ bezeichnet. Durch die DNA-Polymerase erfolgt nun in der sog. Elongationsphase die Synthese der DNA - ausgehend von den beiden Primern in 5'-3'-Richtung durch den Einbau der entsprechenden Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) aus dem Reaktionsansatz. Die Einzelschritte der Polymerase-Ketten-Reaktion werden in mehreren Zyklen wiederholt. Für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde ein automatischer Thermocycler (PCR-Maschine) eingesetzt.

Reaktionsansätze für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden nach folgendem Schema zusammengestellt:

Primer 1	10 pmol
Primer 2	10 pmol
Ausgangs-DNA (Templat)	50-100 ng
10x Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs	200 µM
DNA-Polymerase	2,5 U
H ₂ O	

Gesamtvolumen : 50 µl

Der Ablauf der PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Denaturierung : 94°C, Dauer 30 sec

Annealing: 40-65°C, Dauer 30 sec

Elongation: 72°C, Dauer 30-90 sec

In der Regel wurden 30-40 Zyklen durchgeführt.

Die Annealingtemperatur wurde nach folgender Näherungsformel festgelegt (bezugnehmend auf die in den eingesetzten Oligonukleotiden enthaltenen Basen): pro enthaltenem A/T 2°C, pro enthaltenem C/G 4°C, Addition der Temperaturen. Eine niedrige Annealingtemperatur birgt die Gefahr einer unspezifischer Bindung der Oligonukleotide, d.h. eine unspezifische

Amplifikation der DNA, eine hohe Annealingtemperatur die Gefahr einer mangelnden Bindung der Primer an die DNA.

Die Dauer der Elongationsphase wurde der Größe des zu amplifizierenden Fragments angepasst.

Enzymatische Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten wurde durchgeführt für die Ligation komplementärer DNA-Enden („sticky ends“) bzw. zur Restriktionslängenanalyse von DNA (Kontrolle von PCR-Amplifikationen oder Plasmiden).

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten durch Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlenen Puffer- sowie Temperaturbedingungen. Für die Spaltung wurden 2 –10 µg Plasmid-DNA bzw. das gefällte PCR-Fragment unter Zugabe von 2-5 Einheiten Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50-300 µl eingesetzt. Die Restriktionsspaltung erfolgte - falls vom Hersteller nicht anders empfohlen - für 2-5h bei einer Temperatur von 37° C. Bei einem Mehrfachverdau durch Restriktionsendonukleasen, deren empfohlene Pufferbedingungen sich unterschieden, erfolgte zunächst die Spaltung durch das Enzym, dessen Pufferbedingungen den niedrigeren Salzgehalt aufwiesen, in einem Zwischenschritt die Fällung der DNA mittels Ethanol und Na-Acetat und im Anschluss der Restriktionsverdau durch das Enzym, dessen Pufferbedingungen einen höheren Salzgehalt erforderten. Zur Kontrolle der Spaltung wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Abbau von 5'-überhängenden Enden

Um den Abbau 5'-überhängender Enden eines DNA-Fragments nach der enzymatischen Spaltung durch Restriktionsendonukleasen zu erreichen, wurde das entsprechende DNA-Fragment zunächst mittels Ethanol gefällt und dann in einem PCR-Ansatz (ohne Primerzugabe) unter Verwendung der Pfu-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 10 min bei 72° C inkubiert. Hierbei entsteht durch die Elongation des 3'-Stranges mit Nukleotiden durch die Polymerase ein glattes Ende des DNA-Fragments. Anschließend erfolgte eine erneute Fällung des DNA-Fragments mittels Ethanol.

Ethanol-fällung

Natriumacetat: 3 M Natriumacetat, pH 3,5

Die Methode der Fällung von Nucleinsäuren mittels Ethanol wurde zur Unterbrechung enzymatischer Reaktionen sowie zur Konzentrierung von DNA angewandt. Hierbei wurde der die zu fällenden DNA enthaltenden Lösung 1/10 Volumen Natriumacetat gemischt, anschließend das 2,5fache Gesamtvolumen an 100% Ethanol zugegeben und diese Suspension 60 min bei -80° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4° C. Das hierbei entstandene Pellet wurde zunächst mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend an Luft getrocknet und in Wasser gelöst.

Agarosegelelektrophorese

10 x TBE: 90mM Tris-HCl pH 8,3, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA

DNA-Auftragspuffer: 10mM EDTA, 5% Glycerin, 0,5% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Kontrolle von Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmenten sowie nach enzymatischer Spaltung durch Restriktionendonukleasen eingesetzt. Hierbei wurde zu 1xTBE-Puffer je nach Größe des Plasmids/DNA-Fragments Agarose in einer Gesamtkonzentration von 1-2 % zugegeben sowie durch Erhitzen über 100° C in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Lösung in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer überführt. Nach dem Erkalten wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine Laufkammer, welche mit 1xTBE-Puffer unter Beigabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml gefüllt wurde, transferiert. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer in einem Verhältnis von 1:5 versehen und in die Geltaschen gefüllt. Bei Verwendung von λ-Marker wurde diese vor dem Auftragen für 4 min auf 65° C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100-200 V für 30-60 min. Hierbei wandert die im Bereich der Kathode eingebrachte negativ geladene DNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode durch das Agarosegel, wobei sie sich entsprechend ihrer Größe auftrennt. Das im Bereich der Anode eingebrachte positiv geladene Ethidiumbromid wandert in Richtung des Minus-Poles und lagert sich dabei in die im Gel befindliche DNA ein. Somit konnte die aufgetrennte DNA im Gel nach der Elektrophorese mittels eines UV-Transilluminators analysiert werden.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um eine DNA-Bande nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das die gewünschte DNA-Bande enthaltende Gelstück zunächst unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte dann mittels des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) gemäss Herstellerangaben. Hierbei wurde zunächst das entsprechende Agarosegelstück verflüssigt, die Suspension auf Agarosegeleextraktionssäulen gegeben, wobei die in der Suspension enthaltene DNA an die Silicagelmembran der Säulen gebunden und nach mehreren Waschschritten schließlich mittels Wasser eluiert wurde. Das genaue Protokoll der Agarosegeleextraktion ist dem Arbeitsmanual des Herstellers zu entnehmen.

DNA-Ligation

Der Ligation eines Vektorplasmids (d.h. Trägerplasmids) mit einem DNA-Insert zu einem transfizierbaren Gesamtplasmid liegt die ATP-abhängige Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung einer 5'-Phosphatgruppe mit einer 3'-OH-Gruppe durch die T4-DNA-Ligase zugrunde. Vektor und Insert wurden hierbei im Falle einer Ligation von überhängenden Enden (sticky ends) im molaren Verhältnis 1:1, bei Ligationen mit einem auf einer Seite überhängenden und auf der anderen Seite einem glatten Ende (blunt end) im molaren Verhältnis 1:2 eingesetzt. Die Ligrationsreaktion von Vektor und Insert erfolgte unter Zusatz von Ligationpuffer sowie 10 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 16h bei 16° C und anschließender Inkubation bei 4° für einen Zeitraum von mind. 4h.

2.2.2 Methoden zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2

Klonierung zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2

Die im weiteren experimentellen Vorgehen erforderliche Mutation der TPR-Domäne im XAP2-Wildtypprotein bzw. XAP2-FLAG-Wildtypprotein wurde mittels zweier verschiedener Klonierungsstrategien bzw. Mutationsmethoden eingebracht. Das sog. FLAG-Epitop bezeichnet hierbei eine etablierte charakteristische Abfolge von 8 Aminosäuren, welche man

z.B. mittels kommerziell erhältlicher Antikörper zuverlässig detektieren kann. Das Einbringen von FLAG-Epitopen in Plasmide und damit in die exprimierten Proteine erleichtert daher die Durchführung verschiedener Methoden wie der Westernblotanalyse und der Co-Immunopräzipitation (s. 2.2.8).

Die Methode zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2 ist unter 3.2.2 näher beschrieben.

Die PCR-Produkte wurden vor der weiteren Verwendung jeweils durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Das Endplasmid wurde durch Sequenzierung bei einer Fremdfirma verifiziert.

Mutagenese zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2-FLAG

Zur Einführung der TPR-Mutation in das PCI-XAP2-FLAG-Plasmid wurde der QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Hierbei wurde zunächst eine PCR des gesamten Ausgangsplasmides unter Verwendung zweier, den beiden DNA-Strängen komplementärer und die gewünschte Mutation enthaltender Oligonukleotide durch die eingesetzte PfuTurbo-DNA-Polymerase durchgeführt. In einem anschließenden Verdau des gesamten PCR-Ansatzes mit der Endonuklease DpnI wurde das unmutierte Ausgangsplasmid aufgrund seiner Methylierung abgebaut. Der nun nur noch das mutierte PCR-Produkt enthaltende Ansatz wurde zur Amplifikation in kompetente Bakterienzellen transformiert.

2.2.3 Bakterienkultur

Präparation kompetenter Bakterien zur Plasmidamplifikation

Zur Amplifikation, d.h. zur Herstellung größerer Mengen von Plasmid-DNA z.B. für Transfektionen wurden E. coli DH5 α -Bakterien verwendet, welche zunächst kommerziell erworben und im Folgenden weitergezüchtet wurden. Um die Bakterien zur Aufnahme und damit Vervielfältigung der eingebrachten Fremdplasmid-DNA zu befähigen, fand folgende Methode zur Herstellung „kompetenter“ Bakterien Anwendung:

Zunächst wurden 10 ml Kultur des E. coli-Stammes in nativem TB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in ein Volumen von 150 ml TB-Medium aufgenommen und weiter unter Schütteln bei 37 °C bis zum Erreichen einer spektrophotometrisch bestimmten maximalen OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension zunächst für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer anschließenden zehnmütigen Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C wurden die sedimentierten Bakterien in 45 ml vorgekühltem TFB1-Puffer auf Eis resuspendiert. Es folgte eine 90minütige Inkubation der Suspension auf Eis sowie eine erneute Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C. Das Bakterienpellet wurde dann in 6 ml gekühltem TFB2-Puffer aufgenommen. Die kompetenten Bakterien wurden umgehend mittels eines Trockeneis-Ethanolbades gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lösungen:

TFB1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, Sterilfiltration

TFB2: 75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH-Einstellung durch KOH-Zugabe auf 6,8, Sterilfiltration

TB-Medium: 24g Hefeextrakt, 12 g Trypton, 4 ml Glycerin in 100 ml H₂O, Autoklavierung 12,5 g K₂HPO₄ sowie 2,3 g KH₂PO₄ in 100 ml H₂O, Autoklavierung, Zusammenfügen beider Lösungen

Transformation

LB-Agarplatten: 20 g LB-Broth-Base, 15 g Agar-Agar in 1 l H₂O, Autoklavierung, Antibiotikazugabe

In einem zweiten Schritt wurde in die nun „kompetenten“ Bakterien die zu amplifizierende Plasmid-DNA (Transformation) eingebracht. Hierzu wurden die bei – 80 °C gelagerten kompetenten E. coli DH5α zunächst rasch aufgetaut. Zu 50 µl der aufgetauten Bakteriensuspension wurden 10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und diese 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser sog. Transformationsansatz für 45 sec auf 42 °C erhitzt, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Es folgte eine Zugabe von 400 µl SOC-Medium sowie eine einstündige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln. Hieran schloss sich entweder das Animpfen einer Übernachtskultur oder das Ausstreichen auf einer Agarplatte an – jeweils versehen mit der dem eingebrachten Plasmid entsprechenden Antibiotikazugabe.

Kultur von E. coli

TB-Medium: s.o.

Antibiotikazusatz: Ampicillin: 100 µg/ml
Kanamycin: 25 µg/ml

Der entsprechend transformierte Bakterienstamm wurde entweder einer Einzelkolonie einer Agarplatte, einer gelagerten Glycerinkultur des transformierten Bakterienstammes oder direkt einem Transformationsansatz entnommen, einem Liter sterilem TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz zugegeben und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte entsprechend den Methoden der Mini- bzw. Maxipräparation (s.2.2.4).

Zur Herstellung von Glycerinkulturen der transformierten Bakterienstämme zum Zwecke der längerfristigen Lagerung wurde 1 ml der Übernachtskulturen bei 3500 rpm zentrifugiert und das entstandene Bakterienpellet in 250 µl TB- Medium mit 50% Glycerinzusatz aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.4 DNA-Präparation und Reinigung

Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA nach der Transformation und Kultur in E. coli zur späteren Verwendung in der Transfektion oder zur Analyse erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge im Rahmen einer Mini- oder Maxipräparation.

Die Methode der Minipräparation wurde zur Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA oder zur Analyse von Einzelkolonien eingesetzt.

Bei der dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit zugrundeliegende Plasmidpräparationsmethode bindet DNA in Abhängigkeit von der Ionenstärke selektiv sowie reversibel an Silicagel-Membranen.

Für eine DNA-Präparation wurden Einzelkolonien von LB-Agarplatten bzw. Transformationsansatz in 5 ml TB-Medium mit Antibiotikazusatz angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach 10minütiger Zentrifugation bei 3500 rpm zunächst eine alkalische Lyse des entstandenen Bakterienpellets, bei der eine Denaturierung der DNA sowie eine Destruktion etwaig vorhandener RNA erfolgt. Beim anschließenden Neutralisationsschritt erfolgt ein Ausfällen der vorhandenen

chromosomalen DNA sowie des Zelldetritus, welche im Folgenden abzentrifugiert wurden. Das so entstandene Lysat wurde anschließend auf eine die Silicagel-Membran enthaltende Zentrifugationssäule überführt. Die Bindung der DNA an die Membran erfolgt hierbei unter Hochsalzbedingungen, die Eluierung der gebundenen DNA erfolgte nach Ablauf mehrerer Reinigungsschritte mit Wasser.

Die Zusammensetzung der eingesetzten Puffer sowie das genaue Präparationsprotokoll sind dem Arbeitsmanual des Herstellers zu entnehmen.

Maxipräparation von Plasmid-DNA

Puffer:

S1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, RNase-Zugabe von 100µg/ml, Lagerung bei 4°C

S2: 200 mM NaOH, 1% SDS

S3: 2,8 M Kaliumacetat, pH-Einstellung auf 5,1 mit Essigsäure

N2: 900 mM KCl, 100 mM Tris, 15 % EtOH, pH-Einstellung mit H₃PO₄ auf 6,3

N3: 1150 mM KCl, 100 mM Tris, 15 % EtOH, pH-Einstellung mit H₃PO₄ auf 6,3

N5: 1000 mM KCl, 100 mM Tris, 15 % EtOH, pH-Einstellung mit H₃PO₄ auf 8,5

Diese Methode wurde zur Präparation grösserer Mengen Plasmid-DNA von hohem Reinheitsgrad eingesetzt.

Hierbei wurden Bakterien aus einer Übernachtskultur in einem Volumen von 500 ml TB-Medium mit entsprechender Antibiotikazugabe durch Zentrifugation bei 3500 rpm und 4 °C für 20 min pelletiert.

Nach anschließender Lyse wurde die im Lysat enthaltene Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauschersäule gebunden, nach einem Reinigungsschritt mit Hochsalzpuffer eluiert und anschließend mit Isopropanol ausgefällt.

Das detaillierte Präparationsprotokoll ist dem Arbeitsmanual des Herstellers zu entnehmen.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA, beispielsweise zur exakten Bestimmung der zu transfizierenden Plasmidsuspensionsmenge erfolgte spektralphotometrisch. Da bei DNA-Lösungen die bei einer Wellenlänge von 260 nm spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ($E = \epsilon \times c \times d$, wobei E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Schichtdicke in cm) proportional der Konzentration ist, wurde zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen eine photometrische Messung der Extinktion (A) bei genannter Wellenlänge in einer Quarzküvette (Dicke 1 cm) durchgeführt. Die zu messende DNA-Lösung wurde hierbei so verdünnt, dass sie sich in einem linearen Messbereich befand. Zur Kontrolle der so ermittelten DNA-Konzentration wurde i.d.R. auch eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, bei der die aufgetragene Menge an DNA mit der Intensität einer standardisierten Marker-Bande verglichen wurde.

2.2.5 Zellkultur

Die Kultur der im Rahmen der Transfektionen verwendeten humanen Zelllinien erfolgte unter Verwendung folgender Methoden:

Lösungen

Trypsin:

Zur Herstellung von Trypsinlösung zur Anwendung in der Zellkultur wurde eine Suspension aus 100 ml Trypsin-EDTA, 800 ml endotoxinfreiem Wasser sowie 100 ml EBSS hergestellt und diese dann sterilfiltriert. Die Trypsinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

Aktivkohle-Dextranmischung:

Zur Herstellung von Aktivkohle-Dextranmischung wurden zunächst 500 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8 mit 50 g Aktivkohle 10 min unter Rühren inkubiert. Nach einer kurzen Pause, die dem Sedimentieren der Aktivkohle diente, wurde dieser Inkubationsschritt wiederholt. Nach der Zugabe von 5 g DextranT70 sowie 400 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0 erfolgte das Autoklavieren der Aktivkohle-Dextranmischung. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

Steroidfreies FBS:

Zur Herstellung von steroidfreiem FBS zur Verwendung in der Zellkultur wurden zunächst 500 ml FBS aufgetaut und für 30 min bei 56° C inkubiert. Nach Zugabe von 25 g AG1-X8 Resin wurde die Lösung 16 h unter Rühren bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte zunächst das Dekantieren des FBS, anschließend die Zugabe von 10 ml Aktivkohle-Dextranmischung. Die Lösung wurde erneut 16 h unter Rühren bei 4° C inkubiert. Danach erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation der Suspension bei 1000 rpm, daraufhin die Sterilfiltration des entstandenen Überstandes. Bis zur weiteren Verwendung in der Zellkultur wurde steroidfreies FBS bei -20° C gelagert.

Vermehrung, Lagerung und Inkulturnahme

Die verwendeten Zelllinien wurden als adhärenente Zellen in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde DMEM-Medium unter Zugabe von 10% FBS, 1% Antibiotikazusatz und 1% Pyruvat verwendet. Zellen, die für Transfektionen mit anschließenden Reporteragen-Assays verwendet wurden, wurden 2 Tage vor der Transfektion in steroidfreies Medium (d.h. Medium mit steroidfreiem FBS) überführt, für Zellen, die für Transfektionen mit anschließender Fluoreszenzanalyse oder Gaussia-Luciferase-Messung im Überstand verwendet wurden, war das verwendete Medium zusätzlich auch frei von Phenolrot. Alle Zelllinien wurden in einem 37° C-Begasungsbrutschrank bei 5% CO₂ kultiviert. Alle eingesetzten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung in der Zellkultur in einem 37° C-Wasserbad vorgewärmt.

Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese zunächst aus dem Stickstofftank entnommen und rasch aufgetaut. Um das im Einfriermedium enthaltene zytotoxische DMSO schnellstmöglich aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde diese unmittelbar nach dem Auftauen in frisches Medium überführt und für 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine sterile Zellkulturflasche überführt.

Sobald im Laufe der Inkubation im Begasungsbrutschrank in den Zellkulturflaschen ein dichter Zellrasen erreicht wurde, erfolgte eine Ausdünnung der Zellen (je nach Zelllinie bei

einem Konfluenzgrad von 75-95%). Hierzu wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt, zur Entfernung etwaig verbliebener Reste an Medium der Zellrasen vorsichtig mit PBS gespült, dieses dann wieder entfernt und 1 ml Trypsin auf die adhärierenden Zellen gegeben. Nach dem durch das Trypsin verursachten Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde diese Reaktion durch Zugabe von frischem, Antitrypsin enthaltenden Medium unterbrochen. Das so entstandene Zell-Medium-Gemisch wurde daraufhin in ein steriles Gefäß überführt und 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in einer dem gewünschtem Verdünnungsgrad entsprechenden Menge frischen Mediums resuspendiert und in eine sterile Zellkulturflasche überführt. Die Verdünnung erfolgte je nach Bedarf und Zelllinie in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10.

Zum Einfrieren wurde das entsprechend gewonnene Zellpellet einer konfluenten Zellkulturflasche in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde zunächst mind. 24 h bei -20°C gelagert und anschließend dauerhaft in flüssigen Stickstoff überführt.

Test auf Kontamination mit Mykoplasmen

Mykoplasmen stellen weit verbreitete, sich extrazellulär vermehrende Bakterien dar, welche nur eine Zytoplasmamembran, jedoch keine starre Zellwand aufweisen. Da Kontaminationen mit Mykoplasmen in Zellkulturen nicht nur relativ häufig vorkommen, sondern auch Morphologie und Metabolismus der Zellen beeinflussen können, wurden regelmäßige Testungen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen durchgeführt. Da diese aufgrund ihrer fehlenden Zellwand nicht nur pleomorph sind, d.h. in unterschiedlicher morphologischer Struktur auftreten (u.a. als kokkoide Zellen, aber auch in Fadenform) und dazu neigen, bei der Gramfärbung zu zerfallen, wird zum Nachweis von Mykoplasmen ein spezielles Verfahren angewandt. Hierbei wurde zunächst mit einem speziellen Farbstoff (Bisbenzimid) Doppelstrang-DNA angefärbt und diese dann fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Hierzu wurde eine 100mm Kulturplatte der zu untersuchenden Zelllinie bis zu etwa 80%iger Dichte herangezogen. In einem ersten Schritt wurde das Medium vollständig entfernt, dann 5ml einer $1\ \mu\text{g}$ Bisbenzimid/ml enthaltenden Lösung zugegeben und die Zellen hiermit 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Farbstoffes erfolgte eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Kontaminationen mit Mykoplasmen stellen sich hierbei im Gegensatz zu den scharf definierten Zellkernen der untersuchten Zelllinie als unscharf begrenzte zytoplasmatische oder extrazelluläre Fluoreszenz dar.

2.2.6 Transfektionsmethoden

Elektroporation

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen, z.B. zur späteren Verwendung im Rahmen von Funktionsuntersuchungen. In der vorliegenden Arbeit fanden zwei verschiedene Transfektionsmethoden Anwendung – die Elektroporation und die Transfektion mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz.

Puffer:

Elektroporationspuffer: 50 mM K_2HPO_4 , 20 mM Kaliumacetat, pH-Einstellung mit Essigsäure auf 7,35, Sterilfiltration

Magnesiumsulfatpuffer: 1 M MgSO_4 , pH 6,7, Autoklavierung

Bei der Elektroporation als Transfektionsmethode führen eingesetzte Stromimpulse kurzfristig zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembranen und daher zur Aufnahme von DNA in Plasmidform in eukaryote Zellen.

Hierzu wurden zunächst Zellen der zu untersuchenden Zelllinie zwei Tage vor der Transfektion unter Verwendung von steroidfreiem Medium in 100 mm Kulturschalen überführt und weiterhin in einem Begasungsbrutschrank bei 37° C inkubiert. Pro Untersuchungsansatz wurden die Zellen einer nun dicht gewachsenen Kulturplatte (etwa 10⁷ Zellen/Platte) gewaschen und pelletiert (s. 2.2.5). Das Zellpellet wurde in 390 µl Elektroporationspuffer mit 10 µl Magnesiumsulfatpuffer unter Zugabe der entsprechenden zu transfizierenden Plasmid-DNA aufgenommen. Bei Experimenten mit mehreren Untersuchungsansätzen wurden die Zellpellets der einzelnen Kulturschalen zunächst vereinigt und in der entsprechenden Menge an Puffer resuspendiert. Plasmide, deren Menge innerhalb des Experiments für jeden Untersuchungsansatz konstant gehalten werden sollten (z.B. MTV-Luc etc.) wurden in der Gesamtmenge zugegeben, die Zell-Puffer-Plasmid-Mischung dann zu gleichen Teilen in Reaktionsgefäße überführt und erst dann sich unterscheidende Plasmide/Plasmidmengen zu den einzelnen Untersuchungsansätzen gegeben. Um innerhalb eines Experimentes mit sich hinsichtlich der zu transfizierenden Plasmidmenge unterscheidenden Untersuchungsansätzen (z.B. bei ansteigenden Mengen an transfiziertem Cofaktor) die transfizierte Gesamtplasmidmenge für jeden Ansatz konstant zu halten, wurden diesbezügliche Unterschiede durch Zugabe von „Leer“-Vektor ausgeglichen. Zudem wurde darauf geachtet, die pro Ansatz transfizierten Plasmidmengen auch zwischen vergleichbaren Experimenten konstant zu halten. Für die Elektroporation wurden die Ansätze in Elektroporationsküvetten überführt und bei folgenden Bedingungen, die sich in Vorversuchen als für die jeweilige Zelllinie als optimal erwiesen hatten, elektroporiert: Sk-N-MC-Zellen: 300V, 600 µF; HEK293-Zellen: 350V, 750µF. Anschließend wurden je 150 µl der elektroporierten Zellsuspension pro Ansatz in 60 mm-Kulturschalen überführt, in welchen sich steroidfreies Medium mit Hormon- bzw. Vehikelzusatz befand. Anschließend wurden die Platten 16 h bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert.

Kationisches polymerisches Transfektionsreagenz

Bei der Transfektion mit dem kationischen polymerischen Transfektionsreagenz ExGen 500, einem linearen Polyethylenimin-Derivat mit einem molekularen Gewicht von 22 kDa, werden aufgrund seiner hohen kationischen Ladungsdichte von diesem über ionische Wechselwirkungen Komplexe mit der zugegebenen Plasmid-DNA gebildet. Diese Komplexe lagern sich der Oberfläche der Zelle an und werden von dieser mittels Endozytose aufgenommen. Da die Zellmorphologie bei der Transfektion mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in geringerem Masse als bei anderen Transfektionsmethoden verändert wird, wurde diese Methode zum einen zur Untersuchung der Kerntranslokation mittels Fluoreszenzanalyse eingesetzt (s. 2.2.9). Zum anderen wurde diese Transfektionsmethode aber auch zur Durchführung von Reportergenassys eingesetzt. Hierbei wurden Zellen am Vortag der Transfektion in steroidfreiem phenolrotfreiem Medium in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät (etwa 50 000 Zellen/well). Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit "ExGen 500" entsprechend Herstellerangaben in der Mikrotiterplatte. Nach drei Stunden Inkubation bei 37° C erfolgte die Hormon-/Vehikelzugabe in steroid- und phenolrotfreiem Medium in die Mikrotiterplatte. Im Anschluss wurde die Platte 16 h bei 37° inkubiert. Auch bei dieser Transfektionsmethode wurden die unter 2.2.7 beschriebenen Maßnahmen zur Konstanthaltung von Plasmidmengen und -verteilungen durchgeführt.

2.2.7 Messung der Glukokortikoidrezeptoraktivität mittels Reporteragen-Assay

Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität des Glukokortikoidrezeptors unter verschiedenen Hormon- und Cofaktorbedingungen wurde das sog. Luciferase-Reporteragen-Assay verwendet. Zugrundeliegend ist hierbei die Rolle des GR als Transkriptionsfaktor. Grundsätzlich wird in einem Reporteragen-Assay ein sogenanntes Reporteragen eingesetzt, dessen Expression von Promotoren reguliert wird, welche Bindungsstellen des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors beinhalten. Im Falle des Luciferase-Reporteragen-Assays handelt es sich hierbei um die Fireflyluciferase unter Kontrolle eines MMTV-Promoters, welcher GR-Bindungsstellen beinhaltet. Die Transkriptionsrate des Reporteragens Firefly-Luciferase ist dabei abhängig von der Bindung/Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors (GR) an die entsprechenden Bindungsstellen des Promotors (MMTV-Promotor). Die von der Firefly-Luciferase katalysierte ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung ihres Substrates Luciferin erfolgt unter Lichtemission. Unter Substratsättigungsbedingungen, welche im Rahmen der Durchführung des Luciferase-Reporteragenassays gegeben waren, ist die Enzymaktivität abhängig von der gebildeten Enzymmenge und daher proportional zur Aktivität des untersuchten Transkriptionsfaktors. Eine Messung der Aktivität der Firefly-Luciferase stellt daher eine sensitive Möglichkeit zur Quantifizierung der Promotoraktivität und damit der GR-Aktivität dar.

Zur Messung der Aktivität des GR mittels Luciferase-Reporteragen-Assay wurde daher bei den entsprechenden Transfektionen mittels Elektroporation/kationischem polymerischem Transfektionsreagenz neben den entsprechenden Cofaktoren und dem zu untersuchenden Rezeptor auch MMTV-Luc-Plasmid cotransfiziert, welches für die Firefly-Luciferase codiert. Die Durchführung der Luciferase-Aktivität erfolgte folgendermaßen:

Luciferase-Lysispuffer: 1mM DTT, 0,1M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,8

Passiv-Lysispuffer:

ATP: 0,1M ATP in H_2O pH 7,0 mit 1N NaOH

0,5M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,8: 400 ml 0,5M K_2HPO_4 mit KH_2PO_4 auf pH 7,8 eingestellt

Luciferin: 10 mg Luciferin in 1ml Methanol gelöst, 400 μ l 0,5M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,8, 1,6 ml H_2O

Die Durchführung des Luciferase-Assays erfolgte 16h nach der Transfektion der Zellen mittels Elektroporation bzw. kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Bei der Transfektion mittels Elektroporation wurden zunächst das Medium aus den Kulturschalen entfernt, die Zellen anschließend in 250 μ l Luciferase-Lysispuffer/Kulturplatte aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden die Reaktionsgefäße anschließend je 3x für 3 min zunächst in ein Ethanol-Trockeneisbad und dann in ein 37° C-Wasserbad gegeben. Im Anschluss erfolgte eine 4minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und RT. Das hierbei entstandene Pellet wurde verworfen, je 50 μ l des Überstandes/Ansatz wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt.

Bei der Transfektion der Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz wurden nach dem Entfernen des Mediums den Zellen 50 μ l Passiv-Lysispuffer /well zugegeben, die Platten anschließend 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Lysate in eine neue 96-well-Platte überführt. Die Bereitstellung des für die Luciferaseaktivitätsmessung nötigen Substratgemisches erfolgte folgendermaßen:

Für n zu messende Proben Mischung aus:

0,5M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,8	10 μ l (x n+8)
0,1M ATP	2,5 μ l (x n+8)
0,1M $MgCl_2$	5 μ l (x n+8)
10mM Luciferin	2 μ l (x n+8)
H_2O	130,5 μ l (x n+8)

Gesamtvolumen:	150 μ l (x n+8)

Um das Totraumvolumen des Injektionssystems des Luminometers auszugleichen, wurde ein höheres Gesamtvolumen hergestellt, als es die Anzahl der einzelnen Proben (n) nötig gemacht hätte.

In beiden Fällen erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität in einem Luminometer, wobei die Photonen-Emission nach automatischer Injektion von 150 μ l Substratgemisch/well für 10 Sekunden gemessen und in RLUs (Relative Light Units) wiedergegeben wurde.

Galaktosidase-Messung

Puffer:

β -Galaktosidase-Puffer: 60 mM Na_2HPO_4 , 50 mM β -Mercaptoethanol, 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1mM $MgCl_2$

ONPG: 2 mg/ml o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid, gelöst in H_2O

Da kleinere Schwankungen hinsichtlich der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Ansätzen einer experimentellen Reihe (d.h. zwischen den einzelnen Küvetten/wells) trotz der Bemühung um größtmögliche Konstanz der eingesetzten experimentellen Bedingungen bei der Methode der Transfektion nicht mit letzter Sicherheit auszuschliessen sind, erfolgte eine interne Kontrolle der Transfektionseffizienz bei jedem Experiment. Hierzu wurde neben der Transfektion der MMTV-Luciferase als Parameter zur Bestimmung der Rezeptoraktivität bei Elektroporationen/Transfektionen mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz auch jeweils ein Kontrollplasmid, welches unabhängig von der Rezeptoraktivität war, kotransfiziert. Bei Elektroporationen wurde hierzu β -Galaktosidase, bei Transfektionen mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz Gaussia-Luciferase eingesetzt. Zugrunde liegend war hierbei die Annahme, dass bei der Kotransfektion verschiedener Plasmide diese - natürlich entsprechend der eingesetzten Menge - mit jeweils gleicher Wahrscheinlichkeit von der Zelle aufgenommen werden. Daher konnte durch eine Cotransfektion von Firefly-Luciferase und β -Galactosidase/Gaussia-Luciferase, durch eine Aktivitätsmessung der letztgenannten, da diese wie erwähnt unabhängig von der Rezeptoraktivität und daher unter Substratsättigungsbedingungen nur abhängig von der Enzymmenge und daher letztlich der Transfektionseffizienz sind, eine Normalisierung der gemessenen Luciferaseaktivität vorgenommen werden. Hierzu wurde neben der Messung der Luciferase-Aktivität auch jeweils die Aktivität der β -Galaktosidase/Gaussia-Luciferase bestimmt und bei der Auswertung zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Die dieser Messung zugrunde liegende Reaktion ist die durch die β -Galactosidase katalysierte Hydrolyse des zugegebenen farblosen Substrates O-Nitrophenyl- β -D-Galactosid (ONPG) zu O-Nitrophenol, welches aufgrund seiner gelben Färbung photometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden konnte.

Zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität zeitgleich mit der Messung der Luciferaseaktivität wurden je 100 μ l β -Galaktosidase-Puffer/well in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Hierzu wurden jeweils 50 μ l des Zelllysates, aus dem auch das

entsprechende Lysatvolumen für die Luciferaseaktivitätsmessung entnommen worden war, gegeben. Nach Zugabe von 20 µl ONPG/well wurden die Proben für 10-30 min bei 37 °C inkubiert, bis eine Gelbfärbung beobachtet werden konnte. Die anschließende Messung der Extinktion der Proben erfolgte in einem Multiphotometer bei 405 nm.

Gaussia-Luciferase-Messung

Puffer:

Renilla-Assay-Puffer: 2,2 M NaCl, 0,22 M K₂PO₄, pH 5,1, 4,4 mM NaEDTA,
0,88 mg/ml BSA

KPO₄: 0,22 M KPO₄, pH 5,1

Puffermischung für die Gaussia-Luciferase-Messung:

Renilla-Assay-Puffer und KPO₄ im Verhältnis 1:1, 1/100 Gesamtvolumen Coelenterazine

Die der Gaussia-Luciferase-Messung zugrundeliegende Reaktion stellt die durch die Gaussia-Luciferase katalysierte sauerstoffabhängige Oxidation von Coelenterazine zu Coelenteramide dar, welche unter Emission von CO₂ und Licht erfolgt. Da die Gaussia-Luciferase von den transfizierten Zellen ins Medium sezerniert wird, erfolgte die Messung der Gaussia-Luciferase-Aktivität im Mediumüberstand, nicht im Zelllysate. Hierzu wurden unmittelbar nach der Luciferaseaktivitätsmessung je 20 µl des Überstandes/Ansatz in eine 96well-Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von 50 µl Puffermischung/well erfolgte unmittelbar die Messung der Photonenemission für 1 sec sowie die Wiedergabe in RLU (Relative Light Units).

Datenauswertung

Für die Auswertung und Interpretation der Daten wurden die gemessenen Werte der Luciferase-Aktivitätsmessung ins Verhältnis zu den Werten der β-Galaktosidase/Gaussia-Luciferase gesetzt, d.h. normalisiert. I.d.R. wurden die Untersuchungsansätze z.B. die verschiedenen Mengen an Cofaktor in Duplikaten durchgeführt, aus denen Mittelwerte gebildet wurden. Anschließend wurde für jeden Untersuchungsansatz das Verhältnis der Werte der mit Hormon zu den ohne Hormon behandelten transfizierten Zellen gebildet, d.h. die Stimulierbarkeit des Rezeptors unter dieser experimentellen Bedingung errechnet. Um eine bessere Anschaulichkeit der Wirkung der Cofaktoren zu erreichen, wurde der Wert der Stimulierbarkeit des Kontrollvektors auf 100% gesetzt, die Stimulierbarkeiten der Bedingungen mit Cofaktoren darauf bezogen.

Zur Überprüfung der Hypothesen ist die Inferenzstatistik indiziert. Als Methode wurde die Multivariate Varianzanalyse (MANOVA, multivariate analysis of variance) mit den Kontrasttests nach dem SPSS-Programm (SPSS V12.0) durchgeführt.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

Proteinkonzentrationsbestimmung und Proteinfällung

Zum quantitativen Nachweis der im Rahmen der Transfektion in die Zellen eingebrachten Cofaktoren bzw. Rezeptoren auf Proteinebene, d.h. auch zur Validierung der erhobenen Funktionsdaten erfolgte eine differenzierte Darstellung der Proteine der einzelnen Funktionsansätze mittels Westernblotanalyse.

Hierzu erfolgte in einem vorbereitenden ersten Schritt die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Proben mittels eines BCA-Kit. Dieser kombiniert die Biuret-Reaktion (Protein und Cu^{2+} führt in alkalischem Milieu zur Bildung von Cu^+) mit der Anwendung des wasserlöslichen Natriumsalzes der Bicinchoninsäure (BCA), welches Cu^+ spezifisch nachweist. Das bei der Bindung zweier BCA-Moleküle mit einem Cu^+ -Ion entstehende violette Reaktionsprodukt weist ein Absorptionsmaximum bei 562 nm auf und kann daher photometrisch quantifiziert werden. Dies erfolgte in einer Mikrotiterplatte durch einen Mikroplattenreader unter Verwendung einer Eichkurve aus definierten Konzentrationen an Rinderserumalbumin. Proben, deren Proteinkonzentration oberhalb des durch die Eichkurve vorgegebenen Messbereiches lagen, wurden bis zum Erreichen desselben im zur Probenpräparation verwendeten Puffer verdünnt. Das detaillierte Protokoll der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels des BCA-Kit ist dem Arbeitsmanual des Herstellers zu entnehmen.

Für die Detektion mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Westernblotanalyse wurde eine für jeden Ansatz konstante Gesamtproteinmenge auf das SDS-Gel aufgetragen; diese lag je nach Fragestellung zwischen 10 und 20 µg.

Bei Transfektionen mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz im 96-well-Format und anschließender Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese wurde aufgrund der geringen Volumina der einzelnen Ansätze keine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Es wurden stattdessen zunächst die Proteine aus den Untersuchungsansätzen nach der Firefly-Luciferase-Messung ausgefällt. Dies erfolgte durch Zugabe von 1/5 Volumen 72% Trichloressigsäure zu den Messansätzen. Nach kurzem Einfrieren wurden die Proben für 60 min bei 30000 x g zentrifugiert, mit -20°C kaltem Aceton gewaschen und 10 min bei 56°C getrocknet. Das entstandene Pellet wurde in 5x Lämmli-Puffer aufgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen. Zur Überprüfung und Quantifizierung der eingesetzten Gesamtproteinmenge pro Ansatz wurde neben der Detektion des untersuchten Proteins auf der gleichen Membran eine Detektion von Aktin (quantitativ sehr stark ausgeprägtes zelluläres Protein) vorgenommen. Die Detektion von Aktin erlaubt den Rückschluss auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge pro Untersuchungsansatz.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In einem zweiten Schritt erfolgte die Auftrennung der einzelnen Proteine des Funktionsansatzes mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2x Sammelgelpuffer: 0,2% SDS, 250 mM Tris.HCl, pH 6,8

3x Trenngelpuffer: 0,3% SDS, 1125 mM Tris-HCl, pH 8,8

5x Lämmli-Auftragspuffer: 25% Glycerin, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblau,
1 M β -Mercaptoethanol, 200 mM Tris-HCl, pH 6,8

10x Laemmli-Laufpuffer: 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,05% SDS, pH 8,3

4%iges Sammelgel: 0,338 ml Acrylamid-Bis, 0,9 ml ddH₂O, 1,25 µl 2x Sammelgelpuffer,
12,5 µl APS, 2,5 µl TEMED

10%iges Trenngel: 2,5 ml Acrylamid-Bis, 2,5 ml ddH₂O, 2,5 ml 3x Trenngelpuffer,
25 µl APS, 6,25 µl TEMED

Fertigung der Polyacrylamidgele:

Ein Polyacrylamid-Gel gliedert sich in ein unten befindliches Trenngel sowie das darüber liegende Sammelgel. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden zunächst zwei dafür geeignete Glasplatten in einer entsprechenden Giessapparatur so zusammengesetzt, dass sich zwischen beiden ein 1 mm breiter Zwischenraum ergab. In diesen wurde nun zuerst die frisch

gefertigte Trenngelsuspension gegeben. Unmittelbar danach wurde diese zur Gewährleistung eines exakten Abschlusses des Trenngels mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde dieses wieder entfernt und das Trenngel nun mit der Sammelgelsuspension überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde umgehend ein Kunststoffkamm eingebracht, der nach der Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt wurde. In die so entstandenen Kammern des Sammelgels konnten später die zu untersuchenden Probengemische eingebracht werden.

Durch die unterschiedlichen Ionen- und pH-Bedingungen von Sammelgel, Trenngel und Puffer wurde erreicht, dass die zunächst das niedriger konzentrierte Sammelgel durchlaufenden Proben beim Übergang in das Trenngel zu einer scharfen Lauffront gebündelt wurden, um zum gleichen Zeitpunkt in das Trenngel überzugehen.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erlaubt es, Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proben zunächst mit 1/5 Volumen Lämmli-Auftragspuffer gemischt und 4 min bei 95° C denaturiert (das im Puffer enthaltene Mercaptoethanol führt hierbei zur Reduzierung von Disulfidbrücken, das stark negativ geladene SDS lagert sich proportional zur Ladung bzw. Grösse der Proteine an diese an). Die Wanderung eines Proteins im elektrischen Feld ist sowohl von der Grösse des Proteins als auch vom Verhältnis von der Proteinladung zur Masse abhängig. Die Anlagerung von SDS führt zu einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Wanderung der Proteine ist daher abhängig vom Molekulargewicht der Proteine, wobei kleine Proteine das elektrische Feld schneller durchlaufen. Die so behandelten Proben wurden ebenso wie ein Proteinmarker in die Kammern des Sammelgels eingebracht. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in einer mit Lämmli-Laufpuffer gefüllten Apparatur bei 140 V für 60-120 min. Daran schloss sich der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran an.

Immunoblotting

Blottingpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl, 20% Methanol

Ponceau: 2% Ponceau S, 30% Sulfosalizylsäure, 30% Trichloressigsäure

1x TBST: 150 mM NaCl, 0,05% TWEEN20, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Die in der SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels der sog. Westernblot-Analyse charakterisiert. Dazu wurden die im Polyacrylamidgel enthaltenen, durch das angelagerte SDS negativ geladenen Proteine zunächst mittels Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zum immunologischen Nachweis der transferierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde diese im weiteren zunächst mit dem primären (d.h. spezifisch gegen das nachzuweisende Protein bzw. ein Epitop desselben gerichteten) Antikörper behandelt. Mit Hilfe eines gegen diesen gerichteten zweiten (sekundären) Antikörpers, der eine Meerrettich-Peroxidase-Kopplung aufweist, konnte die Bindung zwischen beiden Antikörpern und damit das zu detektierende Protein durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Im Detail lautete das Protokoll des Immunoblotting folgendermassen:

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel zunächst in Blottingpuffer äquilibriert und in die Transferapparatur eingelegt. Hierbei wurde das Polyacrylamidgel jeweils zwischen zwei Lagen Filterpapier und eine Nitrozellulosemembran eingebracht. Es wurde darauf geachtet, eine Luftblasenbildung zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für einen Zeitraum von 120 Minuten.

Daraufhin wurde das Gel vorsichtig von der Nitrozellulosemembran getrennt und diese zunächst zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau rot angefärbt, der Farbstoff anschließend

durch Waschen wieder entfernt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken wurde die Membran bei 4° C mit 5% Milchpulver in 1x TBST über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Milch entfernt und die Membran mit dem primären Antikörper bei 4° C über Nacht inkubiert. Am Tag darauf wurde dieser entfernt, die Membran 3x für 10 min mit 1x TBST gewaschen und erneut bei 4° C mit 5% Milchpulver in 1x TBST über Nacht inkubiert. Danach wurde nach Entfernen der Milch der sekundäre Antikörper zugegeben und für 2h inkubiert. Nach erneutem 3maligem Waschen mit TBST wurde die Membran in eine Röntgenfilmkassette überführt, mit ECL-Reaktionsreagenz benetzt und mit einer Kunststoffolie überdeckt. Nach dem Entfernen überschüssiger Reagenz erfolgte das Auflegen eines Photofilmes für die Dauer von 5 s – 10 min unter Dunkelkammerbedingungen. Die durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ katalysierte Oxidation des Farbstoffes Luminol, welcher hierdurch in einen angeregten Zustand versetzt wird und beim Rückgang auf seinen Grundzustand Licht emittiert, führte zu einer Schwärzung des Photofilms. Um diese darzustellen wurde der Film entsprechend mittels Entwickler- und Fixierlösung behandelt und anschließend getrocknet. Die so entstandenen Banden wurden mit dem auf dem Polyacrylamidgel mit aufgetragenen Proteinmarker verglichen.

Co-Immunopräzipitation

Lysispuffer A': 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM Na₂MO₄, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0,5% Triton-100

Die Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation wurde zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Hierbei wurden Zellen mit der FLAG-„getaggt“ Plasmidversion des Proteins, dessen Bindungspartner im weiteren untersucht werden sollten, oder einem ungeflagten Kontrollplasmid transfiziert und diese nach entsprechender Inkubationszeit lysiert. Das, die geflagte Version des zu untersuchenden Proteins bzw. das Kontrollprotein beinhaltende Zellysate wurde daraufhin mit Agarosebeads inkubiert, welche mit anti-FLAG-Antikörper gekoppelt waren. Unter diesen Bedingungen sollte eine Bindung zwischen den geflagten Proteinen und ihren spezifischen Bindungspartnern erhalten bleiben. Nach mehreren Waschschritten, die dazu dienten, unspezifische Bindungspartner sowie verbliebene proteinhaltige Reste des Zellysates zu entfernen, wurde die Bindung zwischen den Agarosebeads und den daran gebundenen Proteinen durch Erhitzen wieder gelöst und diese eluiert. Das Eluat enthielt nach Entfernen der Agarosebeads das eingesetzte FLAG-Protein mit seinen spezifischen Bindungspartnern. Die eluierten Proteine konnten in einem weiteren Schritt nun mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotanalyse nachgewiesen werden. Unspezifische Effekte wurden hierbei durch parallele Präparation eines ungeflagten, d.h. nicht an die Agarose bindenden Proteins kontrolliert.

Das detaillierte Vorgehen bei der Co-Immunopräzipitation lautete wie folgt: Zunächst wurde eine konfluente 100cm-Platten HEK-Zellen mit je 10 µg eines FLAG-getaggt Plasmids oder eines Kontrollplasmids mittels Elektroporation transfiziert und für 48 h bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mittels gekühltem PBS vom Boden der Kulturplatte gelöst und 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Lysis-A'-Puffer unter Zusatz von 10 µl Proteaseinhibitorcocktail aufgenommen und für eine Stunde auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 16000 rpm und 4° C. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet verworfen. Während der Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand wurden die mit anti-FLAG-Antikörper gekoppelte Agarosebeads entsprechend der Herstellerempfehlung präpariert. Daraufhin wurden die Agarosebeads mit der maximal möglichen

Proteinmenge/Lysatmenge versetzt (bei mehreren Untersuchungsansätzen wurde darauf geachtet, für jeden die gleiche Proteinmenge einzusetzen). Sich zwischen den einzelnen Untersuchungsansätzen ergebende differierende Volumina wurden egalisiert, die Proben nun in einem Überkopfschüttler bei 4° C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst 15 sec bei 8000 rpm und 4° C zentrifugiert, der entstandene Überstand abgenommen und das verbleibende Agarosebeadpellet dreimal mit kaltem Lysis-A'-Puffer gewaschen (erneut jeweils 15sekündige Zentrifugation der Proben bei 8000 rpm und 4° C, jeweils Verwerfen des Überstandes). Anschließend wurden die Agarosebeadpellets in jeweils 25 µl 5x-Lämmliauftragspuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen, 5 min bei 95 ° C inkubiert, und 4 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Expressionskontrolle wurden 20 µg Protein/Ansatz auf ein zweites Gel aufgetragen. Beim anschließenden Immunoblotting wurde die Membran mit den transferierten Proteinen aus der Immunopräzipitation mit dem Antikörper gegen das Protein, für das eine mögliche Interaktion mit dem FLAG-Protein (in dieser Arbeit hsp90) untersucht werden sollte, inkubiert. Nach der Detektion wurde die Membran zunächst zum Entfernen der daran gebundenen Antikörper für 2h bei RT mit Strippingbuffer behandelt, anschließend mit 1xTBST gewaschen und über Nacht mit 5%Milch inkubiert. Draufhin erfolgte ein zusätzlicher Nachweis des FLAG-Proteins auf dieser Membran mittels erneuter Westernblotanalyse. Dies wurde durchgeführt, um einerseits eine korrekt stattgefundenene Bindung zwischen FLAG-Protein und Agarosebeads im Verlauf der Präparation sicherzustellen, diese nachzuweisen, zu quantifizieren und damit vergleichen zu können.

Die zweite Membran, die der Expressionskontrolle des transfizierten FLAG-Proteins diene, wurde mit FLAG-Antikörper behandelt und entsprechend detektiert.

2.2.9 Fluoreszenzlokalisierung

Die Fluoreszenzanalyse wurde eingesetzt, um die intrazelluläre Lokalisation des GR unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und darzustellen. Hierzu wurde GFP (green fluorescence protein)-gekoppelter GR in HeLa-Zellen transfiziert, die sich aufgrund ihrer Größe und Morphologie besonders gut für die Fluoreszenzmikroskopie eignen.

In der Vorbereitung wurden HeLa-Zellen (etwa 2×10^5 Zellen/well) zunächst in phenol- und steroidfreiem Medium in eine 6-well-Platte ausgesät, in welcher sich mit 0,1%-Gelatine beschichtete Deckgläschen befanden. Die 6-well-Platte wurde daraufhin zunächst in einem Begasungsbrutschrank bei 37° C inkubiert. Die Transfektion des GFP-GR sowie ggf. weiterer Plasmide erfolgte am nächsten Tag mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz (s. 2.2.6). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entsprechend den experimentellen Bedingungen mit Hormon/Vehikel stimuliert, sofort im Anschluss durch 15minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert und anschließend 2x mit TBST gewaschen. Die Deckgläschen mit den adhärirten Zellen wurden der 6-well-Platte entnommen und mittels Einbettmedium auf Objektträgern fixiert. Diese wurden bis zur Auspolymerisation bei 8 °C gelagert und in einem abschließenden Schritt bei 405 nm mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Experimenteller Plan

Aufbau und Kontrolle eines Meßsystems zur Bestimmung des Einflusses von XAP2 auf die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoidrezeptors

Transfektion eukaryonter Zellen, Funktionsassays



**Untersuchung der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors bei Cotransfektion von XAP2
Ausschluss unspezifischer Mechanismen**

Transfektion eukaryonter Zellen, Funktionsassays, Westernblotanalyse

2 Zelllinien (SK, HEK)

2 Transfektionsmethoden
(kat. polym. Transfektionsr.,
Elektroporation)



Untersuchung der Mechanismen des beobachteten XAP2-Effektes

**Test des Einflusses von XAP2
auf die Proteinstabilität des GR**

*Transfektion, Funktionsassays,
Westernblotanalyse*

**Untersuchung des XAP2-
Effektes bei variablen Hormon-
konzentrationen**

Transfektion, Funktionsassays

**Untersuchung einer möglichen
Abhängigkeit des XAP2-Effektes
von der Interaktion mit hsp90**

*Herstellung einer hsp90-Interaktions
Mutante, Transfektion, Funktions-
assays, Westernblotanalyse*

**Untersuchung eines möglichen
Effektes von XAP2 auf die intra-
zelluläre Lokalisation des GR**

*Transfektion, Fluoreszenzmikroskopie
unter Verwendung eines GFP-GR-
konstrukts*

3. Ergebnisse

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Untersuchung einer möglichen Funktion des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 (XAP2) im Rahmen der Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors gliedert sich im Wesentlichen in drei Abschnitte.

Im ersten Teil werden zunächst Ergebnisse hinsichtlich eines möglichen Effektes von XAP2 auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors im humanen Zellsystem dargestellt. Dieser Abschnitt erfasst auch verschiedene Kontrolluntersuchungen, die einen unspezifischen Mechanismus als Ursache des beobachteten Effektes ausschließen sollten. Hierbei wurden v.a. Methoden der Transfektion humaner Zelllinien, Funktionsuntersuchungen mittels Reporterassays sowie Westernblotanalysen eingesetzt. Bei der Darstellung der Ergebnisse der Transfektionsexperimente erfolgte, falls nicht anders angegeben, die Darstellung der mit den β -Galaktosidase-/Gaussia-Luciferase-Daten normalisierten Fireflyluciferasewerte als Verhältnis der Werte der mit Hormon stimulierten Proben zu den identisch transfizierten Proben, die mit Vehikel inkubiert wurden. Der experimentelle Ansatz, bei dem kein Cofaktor, sondern lediglich Leervektor transfiziert wurde, wurde hierbei als Referenzwert verwendet, zur besseren Veranschaulichung in den Diagrammen wurde die Stimulierbarkeit des Rezeptors unter dieser Bedingung gleich 100 gesetzt und die Stimulierbarkeiten der anderen Bedingungen mit Cofaktor darauf bezogen. Dies stellt die Stimulierbarkeit des Rezeptors unter der jeweiligen experimentellen Bedingung dar. Die in den Diagrammen dargestellten Werte stellen Mittelwerte der jeweils angegebenen Anzahl unabhängiger, jedoch unter identischen Bedingungen durchgeführter Experimente dar. Zusätzlich erfolgte eine Darstellung der Standardabweichung.

Der zweite Abschnitt dieses Ergebnisteils umfasst Untersuchungen sowohl der am beobachteten Effekt beteiligten Strukturdomänen von XAP2 als auch zur Abhängigkeit des beobachteten XAP2-Effektes von der Interaktion mit dem heat-shock-protein 90. In diesem Rahmen wurden neben den bereits genannten experimentellen Verfahren auch die Methode der Co-Immunopräzipitation eingesetzt (s. 2.2.8).

Im letzten Teil dieses Abschnittes wird schließlich die Frage nach einem XAP2-vermittelten Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors als möglichem Mechanismus der Inhibition untersucht. Hierbei findet die unter 2.2.9 näher beschriebene Methode der Fluoreszenzlokalisierung Anwendung.

3.1. Inhibierung der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2

3.1.1 Validierung der verwendeten Untersuchungsmethoden

Vor dem Beginn der Messungen zur Untersuchung eines möglichen Effektes von XAP2 auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors erfolgte zunächst die Validierung und Optimierung der geplanten Testmethoden. Hierzu wurden die beiden TPR-Proteine FKBP51 und FKBP52 verwendet, da diese zum einen große strukturelle Ähnlichkeit mit XAP2 aufweisen (s. 1.2.3, 1.3) und darüber hinaus einen bereits gut untersuchten Effekt auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors aufweisen (Wohnik et al., 2005). FKBP51 und 52 wurden in drei bzw. vier voneinander unabhängigen Experimenten mittels der Methode der Transfektion (s. 2.2.6) in ansteigenden Mengen in eine humane Zelllinie eingebracht. Im Rahmen der anschließenden Durchführung der Funktionsuntersuchungen (s. 2.2.7) zeigte sich bei der Transfektion von FKBP51 eine dosisabhängige Inhibierung der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit (Abb. 5). Bei der Überexpression von FKBP52 war bei

insgesamt wesentlich höherer Varianz kein eindeutiger Effekt auf den Glukokortikoidrezeptor zu beobachten (Abb. 5). Beide Ergebnisse entsprechen dem zu erwartenden Effekt auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors unter FKBP51 bzw. 52 (Wochnik et al., 2005) und stellen daher ein Gütekriterium für die eingesetzten Untersuchungsmethoden dar.

Zu beachten ist allerdings die im Vergleich zu den von Wochnik et al. (2005) beschriebenen Ergebnissen etwas schwächere Ausprägung des inhibitorischen Effektes unter FKBP51. Eine mögliche Erklärung hierfür sind die Unterschiede in den verwendeten experimentellen Bedingungen, z.B. das Einsetzen einer anderen Transfektionsmethode. So setzten Wochnik et al. (2005) die Methode der Elektroporation ein.

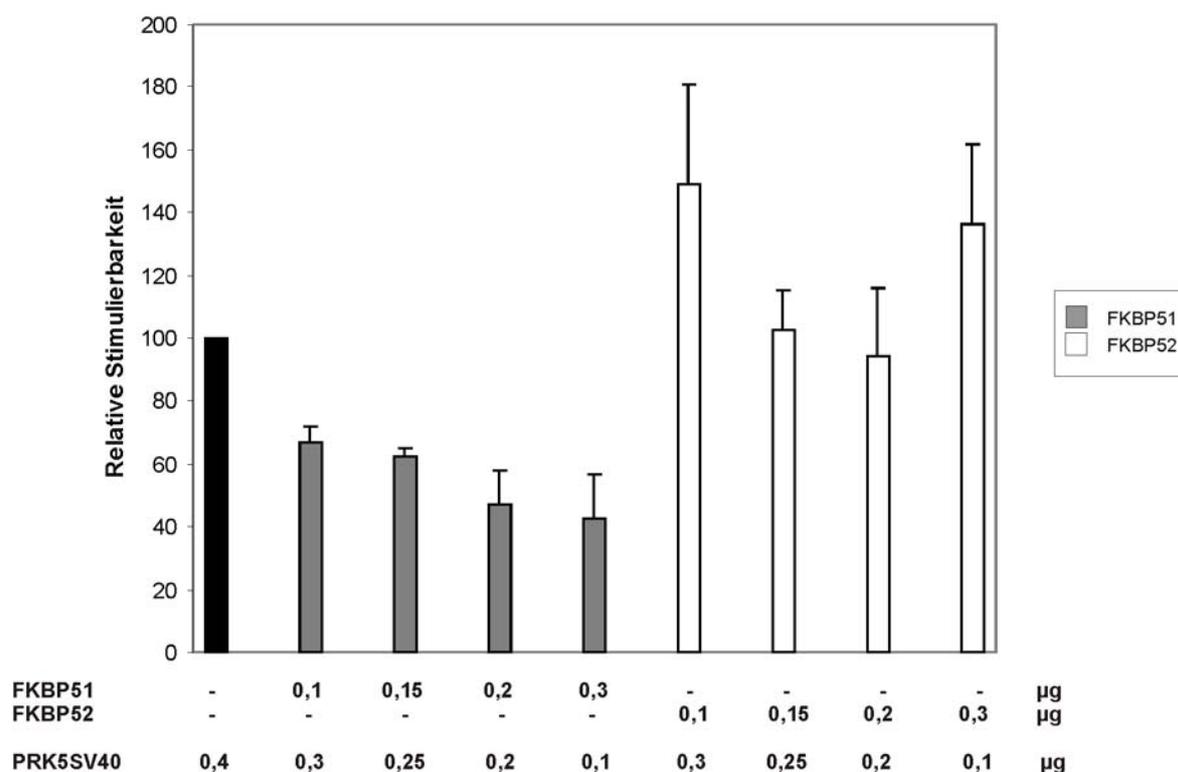


Abb. 5: Unterschiedliche Effekte der Immunophilinen FKBP51 und FKBP52 auf die Transaktivierung des Glukokortikoidrezeptors

Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen der Cofaktoren FKBP51 bzw. FKBP52: SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-FKBP51, FLAG-FKBP52 bzw. „Leer“-Vektor PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Firefly-Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) von 3 (FKBP51flag) bzw. 4 (FKBP52flag) unabhängigen Experimenten (Mittelwerte FKBP51: 100; 67; 62; 47; 43; Mittelwerte FKBP52: 100; 149; 103; 94; 136) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 FKBP51: 0; 5; 3; 11; 14; Standardabweichung/2 FKBP52: 0; 32; 13; 22; 26).

3.1.2 Untersuchung der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter dem Einfluss von XAP2

Im Anschluss an die Validierung der Untersuchungsmethoden erfolgte die Messung der Aktivität des Glukokortikoidrezeptors bei der Transfektion von XAP2. Hierzu wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen in sieben unabhängigen Experimenten XAP2 in ansteigenden Mengen transfiziert. Hierbei zeigte sich bei der Auswertung der Funktionsdaten ein dosisabhängiger hemmender Einfluss von XAP2 auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors (Abb. 6A). Dieser Effekt war bei allen untersuchten XAP2-Konzentrationen statistisch signifikant.

Eine Veränderung der Hintergrundwerte, d.h. der nicht mit Hormon behandelten Untersuchungsansätze bei Transfektion von XAP2 ließ sich nicht beobachten (Abb. 6B). XAP2 zeigt daher offenbar keinen ligandenunabhängigen Effekt auf den Glukokortikoidrezeptor.

Zur Überprüfung der Expression auf Proteinebene wurde bei den Experimenten die mit dem FLAG-Epitop fusionierte Variante von XAP2 eingesetzt. Diese erlaubt den Nachweis der Proteinexpression im Rahmen der Westernblotanalyse. Abb. 6C zeigt das Expressionsniveau von XAP2 auf Proteinebene unter den untersuchten experimentellen Bedingungen mittels Westernblotanalyse eines repräsentativen Experimentes.

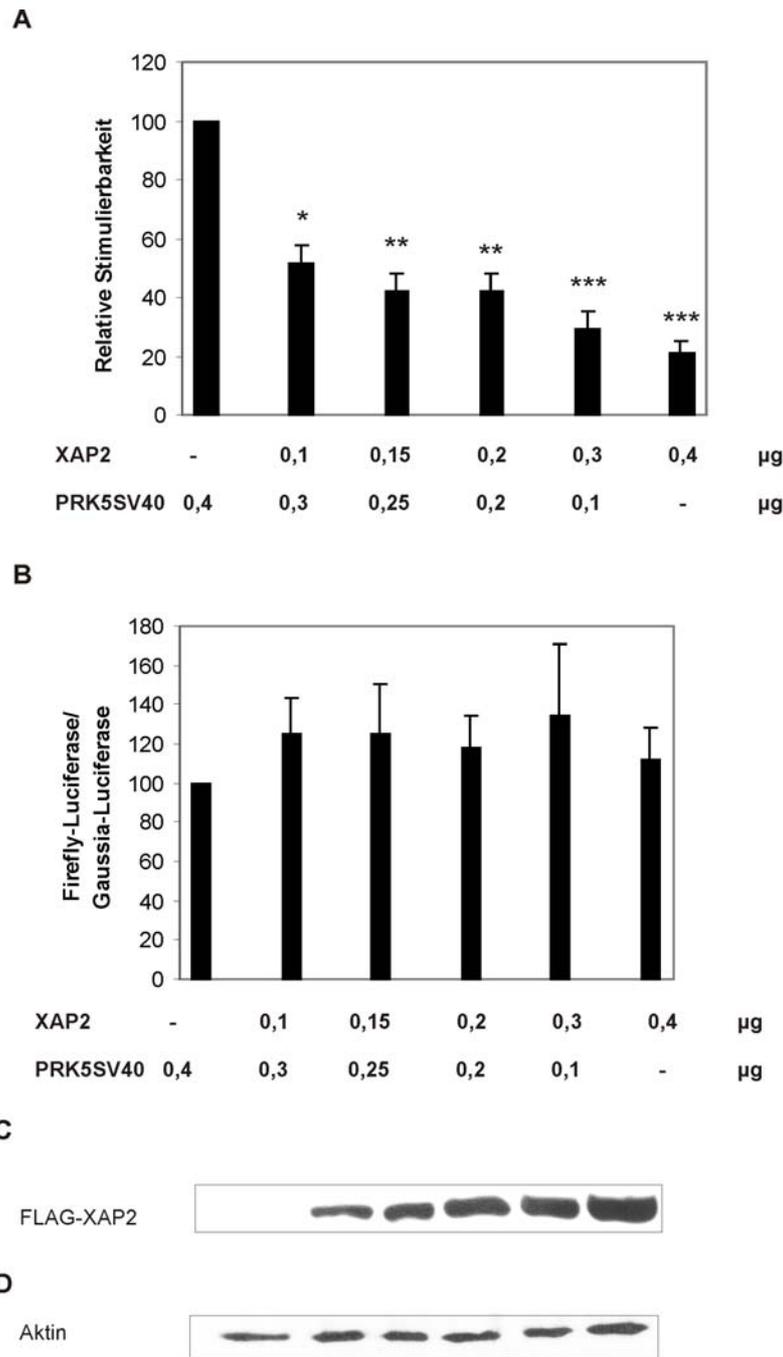


Abb. 6: Hemmung der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit durch XAP2

A: Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Firefly-Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) von 7 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte: 100;

51; 42; 42; 29; 21) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichungen/2: 0; 6; 6; 6; 6; 4).

Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter den verschiedenen XAP2-Treatmentbedingungen (Cortisol- vs. Nicht-Cortisol-Behandlung) und den verschiedenen Mengen an XAP2 [Effekt des Treatments: $F(1,36)=4.74$, Signifikanz von $F=0.036$), Effekt der Menge: $F(5,36)=6.99$, Signifikanz von $F<0.0001$]. Signifikanz 0,1 µg XAP2: 0.01806; 0,15 µg XAP2: 0.00193; 0,2 µg XAP2: 0.00271; 0,3 µg XAP2: 0.00018; 0,4 µg XAP2: 0.00000.

B: Darstellung Grundaktivität des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Gezeigt werden die mit Ethanol inkubierten Untersuchungsansätze der unter A dargestellten experimentellen Reihe. Gezeigt werden die Mittelwerte (arithmetische Mittel) aus 7 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte: 100; 126; 125; 117; 134; 112) als Gaussia-Luciferase-normalisierte Firefly-Luciferase-Messwerte sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichungen/2: 0; 18; 25; 17; 36; 16).

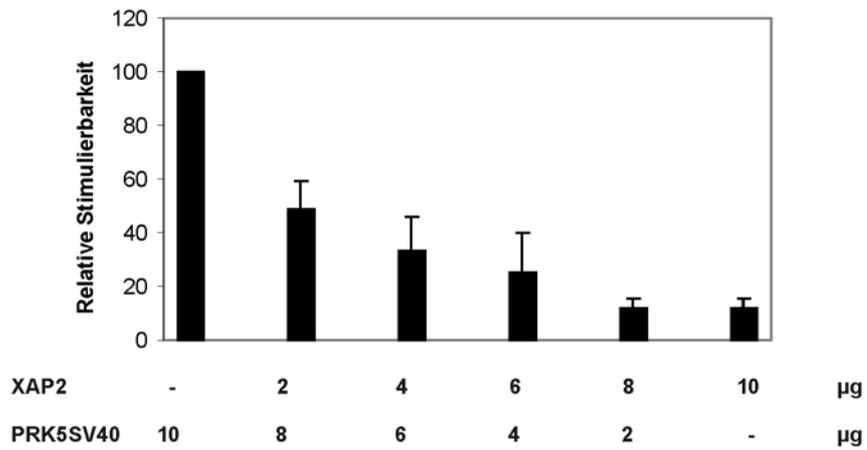
C: Repräsentative Westernblotanalyse des FLAG-getaggten XAP2-Proteins. Hierfür wurden die Proben eines repräsentativen Experimentes der unter B gezeigten Reihe nach der Durchführung der Reporterassays auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Immunoblotting das FLAG-getaggte Protein detektiert.

D: Aktinkontrolle der unter C dargestellten Westernblotanalyse. Hierzu wurde auf der gleichen Nitrozellulosemembran neben dem Nachweis des FLAG-getaggten Proteins auch Aktin detektiert.

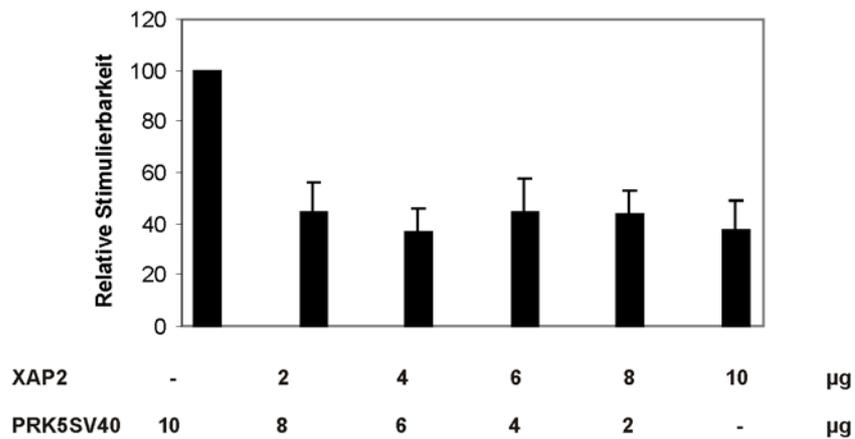
3.1.3 Untersuchung des XAP2-Effektes in Abhängigkeit von Zelllinie und Transfektionsmethode

Um den dem beobachteten XAP2-vermittelten inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors zugrundeliegenden Mechanismus näher zu untersuchen, wurde in einem weiteren Schritt zunächst überprüft, ob es sich um einen zelllinien- oder transfektionsmethodenabhängigen Effekt auf die Rezeptorfunktion handelt. Zu diesem Zweck wurden die beschriebenen Transfektionen von XAP2 sowie die anschließenden Funktionsuntersuchungen sowohl in einem alternativen Zellsystem als auch unter Verwendung einer alternativen Transfektionsmethode wiederholt. In den in diesem Rahmen durchgeführten Experimenten zeigte sich sowohl bei der Verwendung der Transfektionsmethode der Elektroporation als auch in der alternativen Zelllinie HEK 293 eine dosisabhängige Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit unter XAP2 (Abb. 7A,B,C). Ein zelllinien- oder transfektionsmethodenabhängiger Effekt von XAP2 konnte hiermit weitgehend ausgeschlossen werden.

A



B



C

FLAG-XAP2



Abb. 7: Zelllinien- sowie methodenunabhängige Hemmung der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit durch XAP2

A: Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

SK-N-MC-Zellen wurden mittels Elektroporation mit MTV-Luc (1,5 µg/Platte), pCMV-β-Galaktosidase (2,5 µg/Platte), PRK7-GR (1,4 µg/Platte) sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Firefly-Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als

Mittelwerte (arithmetische Mittel) von 8 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte: 100; 49; 33; 25; 12; 12) sowie die Standardabweichung/2 (0; 10; 13; 15; 4; 4).

B: Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

HEK 293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit MTV-Luc (1,5 µg/Platte), pCMV-β-Galaktosidase (2,5 µg/Platte), PRK7-GR (0,8 µg/Platte) sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 1 nM Dexamethason bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Firefly-Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) von 9 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte: 100; 45; 37; 45; 44; 38) sowie die Standardabweichung/2 (11; 9; 13; 9; 11).

C: Repräsentative Westernblotanalyse des FLAG-getaggten XAP2-Proteins. Hierfür wurden die Proben eines repräsentativen Experimentes der unter B gezeigten Reihe nach der Durchführung der Reporterassays auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Immunoblotting das FLAG-getaggte Protein detektiert.

In einem weiteren Schritt war es wesentlich, eine unspezifische, etwa durch Art oder Menge an transfizierten Plasmiden verursachte Hemmung der zellulären Aktivität und damit auch Rezeptoraktivität auszuschließen. Hierzu wurden parallele Transfektionsexperimente mit Plasmiden, welche keinen spezifischen Effekt auf die Aktivierbarkeit erwarten lassen, durchgeführt. In diesem Zusammenhang sind zum einen die bereits beschriebene Untersuchung von FKBP52 (s. 3.1.1) als auch die später genauer dargestellten Funktionsuntersuchungen des GR bei gleichzeitiger Transfektion einer TPR - Domänen-Mutante von FKBP51 (s. 3.2.2) zu beachten. Beide Proteine verfügen über hohe Strukturähnlichkeit mit XAP2 sowie einen bekannten fehlenden Einfluss auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptor (Wohnik et al., 2005). Von besonderer Bedeutung sind jedoch die Ergebnisse der in einem späteren Abschnitt dargestellten Funktionsuntersuchungen einer TPR-Domänen-Mutante von XAP2 selbst (s. 3.2.2).

Alle genannten Plasmide zeigen lediglich bei der Transfektion der maximal eingesetzten Menge an transfiziertem Cofaktor (0,4 µg Cofaktor) eine Inhibition der Rezeptoraktivität, die als unspezifische Inhibition des Rezeptors interpretiert werden muss (Abb. 6A, 12A, 12D). Bei allen anderen untersuchten experimentellen Bedingungen, d.h. Mengen an Cofaktoren, konnte kein inhibitorischer Effekt auf den Rezeptor beobachtet werden. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem beobachteten Effekt von XAP2 um eine unspezifische Hemmung des Rezeptors handelt. Lediglich bei der maximal transfizierten Menge an Cofaktoren muss zusätzlich ein möglicher unspezifischer Anteil an der Inhibition berücksichtigt werden.

3.1.4 Untersuchung der Glukokortikoidrezeptorlevel unter XAP2

Da in der Literatur durch Cofaktoren, z.B. das TPR-Protein CHIP, induzierte Abbauvorgänge des Glukokortikoidrezeptors vorbeschrieben sind (Connell et al., 2001), stellte sich die Frage, ob es sich bei dem beobachteten inhibitorischen Effekt von XAP2 auf den GR möglicherweise ebenfalls um einen Cofaktor-vermittelten Abbau des Rezeptors handelt. Zwar lagen aus der Literatur z.B. im Zusammenhang mit dem Ah-Rezeptor keine Hinweise auf einen derartigen Effekt von XAP2 vor - Veröffentlichungen in diesem Punkt zeigten vielmehr eine Stabilisierung des Ah-Rezeptorlevels durch XAP2 sowie eine Inhibition des Rezeptorabbaus (Meyer et al., 2000; Kazlauskas et al., 2000; Lees et al., 2003) - dennoch konnte ein XAP2-bedingter Abbau des GR nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

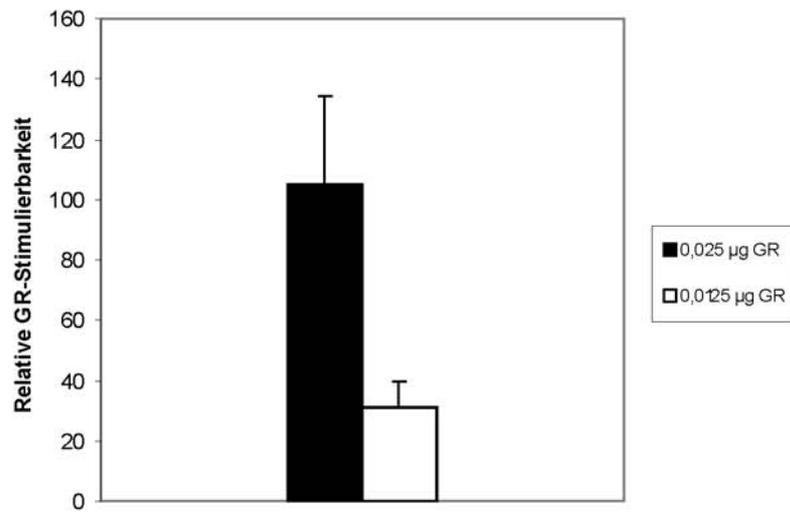
Es wurde daher zunächst überprüft, ob eine Verringerung der cotransfizierten Menge an Glukokortikoidrezeptor sich überhaupt auf die erhobenen Funktionsmessungen des Rezeptors

auswirkt. Hierzu wurde im direkten Vergleich zu den etablierten Bedingungen bei gleichbleibender Cofaktorenmenge eine um die Hälfte reduzierte Menge an Rezeptor transfiziert. Hierbei zeigte sich, dass eine Reduktion der Rezeptormenge eine deutlich verminderte Stimulierbarkeit des Reportergens zur Folge hat (Abb. 8A). Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass unter den etablierten experimentellen Bedingungen so hohe intrazelluläre Rezeptorlevel vorliegen, dass auch eine mögliche Cofaktoren- bedingte Reduktion der Rezeptormenge sich nicht in den Funktionsdaten niederschlagen würde. In einem weiterführenden Schritt wurde daher mittels Westernblotanalyse ein direkter Nachweis der Glukokortikoidrezeptorlevel in Anwesenheit und Abwesenheit von cotransfiziertem XAP2 geführt. Hierbei zeigte sich unter beiden experimentellen Bedingungen ein vergleichbares Rezeptorniveau (Abb. 8C,D). Der beschriebene inhibitorische XAP2-Effekt ist daher nicht auf einen Cofaktor-induzierten Abbau des Glukokortikoidrezeptor zurückzuführen.

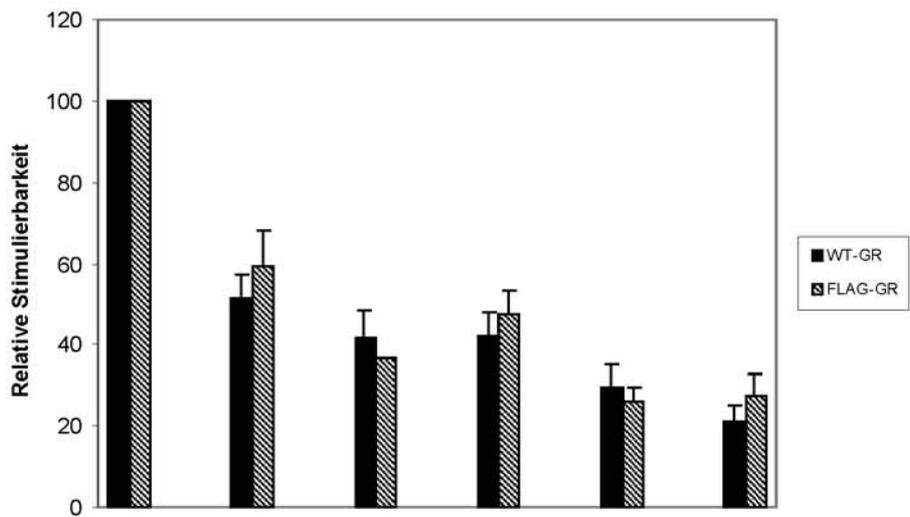
Zur Durchführung der Westernblotanalyse des Glukokortikoidrezeptors wurde im Rahmen der Transfektion eine mit dem FLAG-Epitop fusionierte Variante des Glukokortikoidrezeptors verwendet. In den Funktionsassays zeigte der FLAG-getaggte Rezeptor im Vergleich zum Wildtyp des Rezeptors keinen Unterschied (Abb. 8B).

Im Rahmen dieser Fragestellung wurde zusätzlich überprüft, ob sich der beobachtete XAP2-Effekt von der Menge des cotransfizierten Rezeptors beeinflusst zeigt, z.B. sich nur bei starker Überexpression des GR beobachten lässt. Hierbei zeigte sich, dass sich auch bei einer um die Hälfte reduzierten Rezeptormenge die absolute Höhe der Messwerte im Firefly-Luciferase-Assay zwar deutlich erniedrigt, die Höhe des inhibierenden XAP2-Effekts jedoch im Wesentlichen unverändert war (Abb. 8E). Damit zeigt XAP2 auch unter den natürlichen Bedingungen der Zelle eher entsprechenden Rezeptormengen einen unverändert starken Einfluss auf die Funktion des Rezeptors.

A

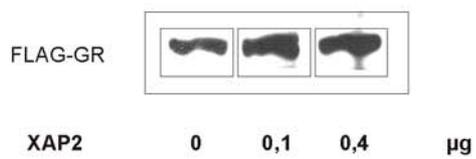


B

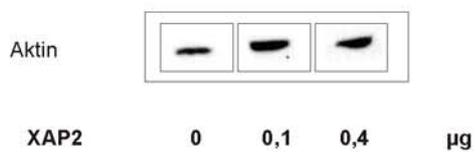


XAP2	-	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	µg
PRK5SV40	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	-	

C



D



E

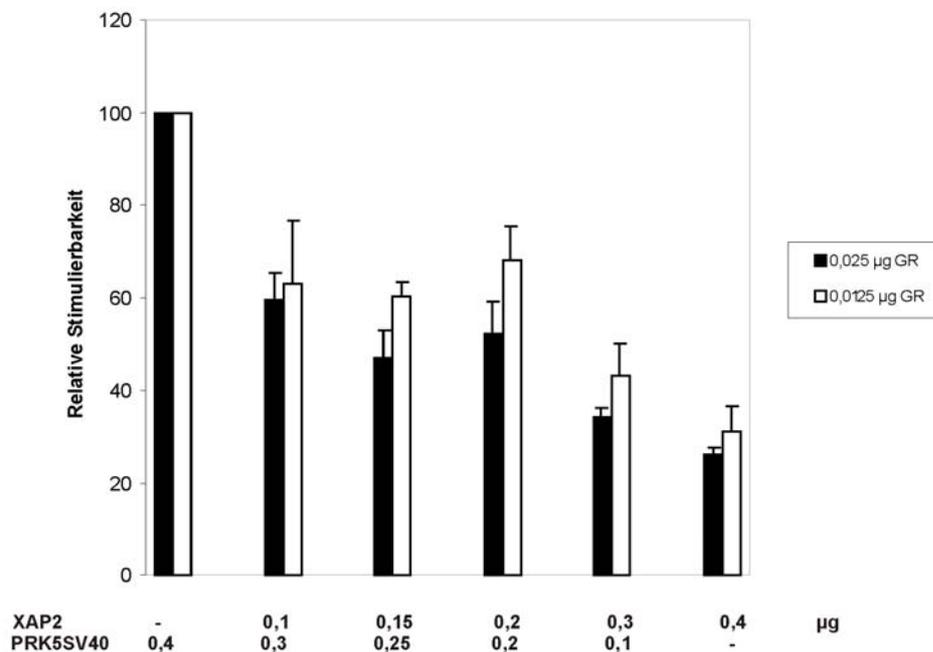


Abb. 8: Ausschluss eines Rezeptorabbaus als Mechanismus der XAP2-induzierten Inhibierung der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit

A: Vergleich der Stimulierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors im Vergleich zweier unterschiedlicher Mengen an transfiziertem Rezeptor.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), sowie Leervektor PRK5SV40 (0,2 µg/well) und 0,025 oder 0,0125 µg PRK7-GR/well transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten bei 0,025 bzw. 0,0125 µg GR als Mittelwert (arithmetische Mittel) von 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwert 0,025 µg GR: 105; Mittelwert 0,0125 µg GR: 31) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 0,025 µg GR; 29; Standardabweichung/2 0,0125 µg GR: 9).

B: Vergleich der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors bei der Transfektion von FLAG-getagtem Rezeptor bzw. „ungetagtem“ GR unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) oder FLAG-PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) von 7 (WT-GR) bzw. 3 (FLAG-GR) unabhängigen Experimenten (Mittelwerte WT-GR: 100; 51; 42; 42; 29; 21; Mittelwerte FLAG-GR: 100; 59; 37; 48; 26; 27) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 WT-GR: 0; 6; 6; 6; 6; 3; Standardabweichung/2 FLAG-GR: 0; 9; 0,3; 6; 4; 5).

C: Repräsentative Westernblotanalyse des FLAG-getaggen GR-Proteins. Hierfür wurden die Proben eines repräsentativen Experimentes der unter B gezeigten Reihe der Transfektionen

mit FLAG-GR nach der Durchführung der Reporterassays auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Immunoblotting das FLAG-getaggte Protein detektiert.

D: Aktinkontrolle der unter C dargestellten Westernblotanalyse. Hierzu wurde auf der gleichen Nitrozellulosemembran neben dem Nachweis des FLAG-getaggten Proteins auch Aktin detektiert.

E: Vergleich der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors in Abhängigkeit von der Menge an transfiziertem Rezeptor unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), sowie FLAG-XAP2 bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen und 0,025 bzw. 0,0125 µg PRK7-GR/well transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten bei 0,025 bzw. 0,0125 µg GR als Mittelwert (arithmetische Mittel) von 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte für 0,0125µg GR: 100; 63; 60; 68; 43; 31; Mittelwerte für 0,025 µg GR: 100; 59; 47; 52; 34; 26) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 für 0,0125 µg GR: 0; 14; 3; 7; 7; 5; Standardabweichung/2 für 0,025 µg GR: 0; 6; 6; 7; 2; 1).

3.1.5 Einfluss veränderter Hormonkonzentrationen auf die XAP2-vermittelte Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit

Um die Frage nach einer Abhängigkeit des XAP2-Effektes von der Menge an vorliegendem Hormon zu untersuchen, wurde die Funktion des Glukokortikoidrezeptors unter XAP2 zusätzlich bei von dem experimentellen Standardsetting abweichenden Hormonkonzentrationen untersucht. Die hierbei eingesetzten Cortisolkonzentrationen wichen jeweils 1 und 2 Zehnerpotenzen von der bisherigen Standardhormonkonzentration ab. Bei der Durchführung dieser Hormonreihe zeigte sich zum einen, dass die Werte der Rezeptoraktivitätsmessung (Firefly-Luciferase-Assay) bei Hormonkonzentrationen, die niedriger als die Standardkonzentration von 10 nM Cortisol waren, sich bei nicht optimaler Transfektionseffizienz den Hintergrundwerten des Messgerätes annäherten. In solchen Fällen können daher die Bedingungen für eine valide Interpretation der Funktionsdaten nicht mehr als gegeben vorausgesetzt werden. Diesem Ergebnis ist aber auch zu entnehmen, dass mit der eingesetzten Standardhormonbedingung die niedrigst mögliche, d.h. den physiologischen Bedingungen am ehesten entsprechende Hormonkonzentration eingesetzt wurde. Der inhibitorische Effekt von XAP2 auf den Glukokortikoidrezeptor nahm mit steigenden Hormonkonzentrationen ab (Abb. 9). Der Umstand, dass die XAP2-vermittelte Inhibition des GR bei subsaturierten Hormonbedingungen wesentlich größer ist als unter Saturierungsbedingungen, d.h. bei Überschuss an Hormon, weist auf eine XAP2-vermittelte Beeinträchtigung der Hormonbindungsfähigkeit des untersuchten Rezeptors als einen wesentlichen Mechanismus hin. Zugrundeliegend ist hierbei die Hypothese, dass die XAP2-induzierte Hemmung der Hormonbindungsaffinität zumindest teilweise durch einen großen Überschuss an Hormon kompensiert wird. Bei fehlendem Effekt auf die Ligandenbindungsaffinität des Rezeptors durch XAP2 wäre ein auch unter höheren Hormonkonzentrationen gleichbleibend starker Effekt zu erwarten.

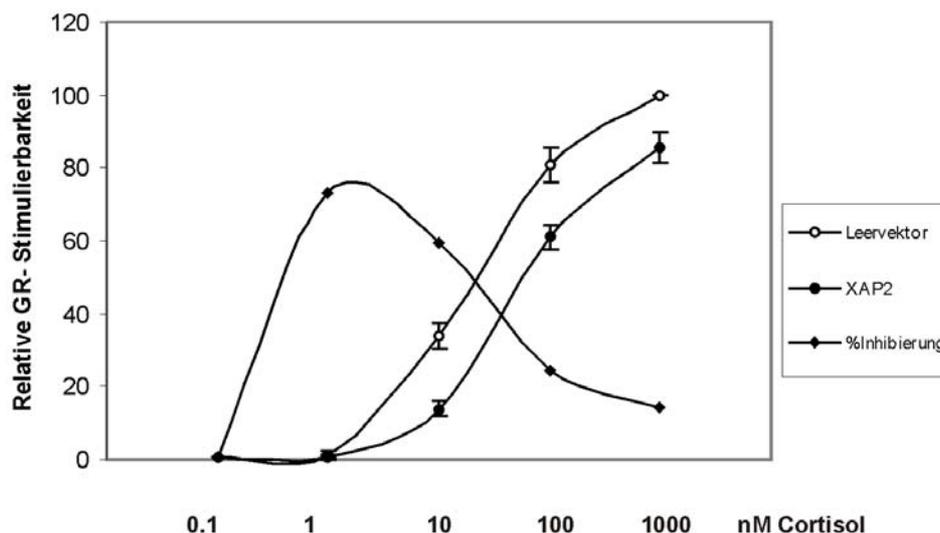


Abb. 9: Untersuchung des Effektes von XAP2 bei verschiedenen Hormonkonzentrationen

Vergleich der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion von XAP2 in Abhängigkeit von der verwendeten Hormonkonzentration.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-XAP2 (0,2 µg/well) oder PRK5SV40 (0,2 µg/well) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit den angegebenen Mengen Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte PRK5SV40: 0,4; 1; 34; 81; 100; Mittelwerte XAP2: 0,4; 0,6; 14; 61; 86; Mittelwerte Inhibierung: 0,4; 73; 60; 24; 14; Standardabweichung/2 PRK5SV40; 0,05; 1; 4; 5; 0; Standardabweichung/2 XAP2: 0,06; 0,2; 2; 3; 4).

Zusammenfassend konnte ein hemmender Effekt von XAP2 auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors gezeigt werden. Unspezifische oder methodeninduzierte Mechanismen konnten ebenso wie ein Cofaktoren-induzierter Rezeptorabbau als Ursache der beobachteten Inhibition ausgeschlossen werden. Die Untersuchung des XAP2-Effektes bei verschiedenen Hormonkonzentrationen lässt eine durch das TPR-Protein verursachte Hemmung der Hormonbindungsfähigkeit als einen wesentlichen Mechanismus vermuten.

3.2 Abhängigkeit der Inhibition des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 von der Interaktion mit hsp90

3.2.1 Nachweis einer XAP2-hsp90-Interaktion

Wie gezeigt werden konnte, inhibiert XAP2 die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors auf spezifische Weise. Von wesentlicher Bedeutung ist daher die Frage nach dem diesem Effekt zugrundeliegenden Mechanismus und damit auch nach den beteiligten strukturellen Domänen von XAP2. Die wesentliche Bedeutung der TPR-Domänen von Cofaktoren bei der funktionellen Regulation nukleärer Rezeptoren wurde in der Literatur bereits beschrieben. So zeigten Wochnik et al. (2005), dass eine Mutation im Bereich einer TPR-Domäne des Cofaktors FKBP51 nicht nur zu einer Aufhebung der Interaktion mit hsp90, sondern auch zu einem Sistieren der beobachteten FKBP51-vermittelten Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivität führt. Wie unter 1.3 beschrieben, enthält XAP2 ebenfalls drei sog. TPR-Domänen. In der Literatur liegen hinsichtlich des Nachweises einer Interaktion von XAP2 und hsp90 bisher uneinheitliche und z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor (Carver et al., 1997; Ma et al., 1997; Meyer et al., 1998/1999/2000; Bell et al., 2000; Kazlauskas et al., 2002; Hollingshead et al., 2004). Unter den Autoren, die eine Interaktion von XAP2 mit hsp90 bestätigten, zeigten Carver et al. (1998) in diesem Zusammenhang die Bedeutung der TPR-Domäne von XAP2. Meyer et al. (2000) sowie Bell et al. (2000), berichteten, dass bereits je ein Aminosäureaustausch im Bereich der dritten TPR-Domäne von XAP2 zur Aufhebung der Bindung an hsp90 führen kann (Meyer et al., 2000: Austausch von Glycin an Position 272 gegen Aspartat/Glutamat; Bell et al., 2000: Lysin an Position 266 gegen Alanin). Andere Veröffentlichungen berichteten über die zusätzliche Notwendigkeit des C-terminalen Bereiches von XAP2 für die Bindung an hsp90 (Meyer et al., 1999; Kazlauskas et al., 2002).

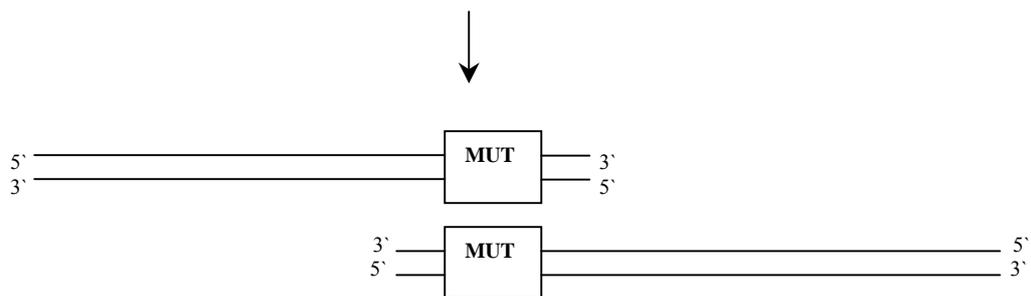
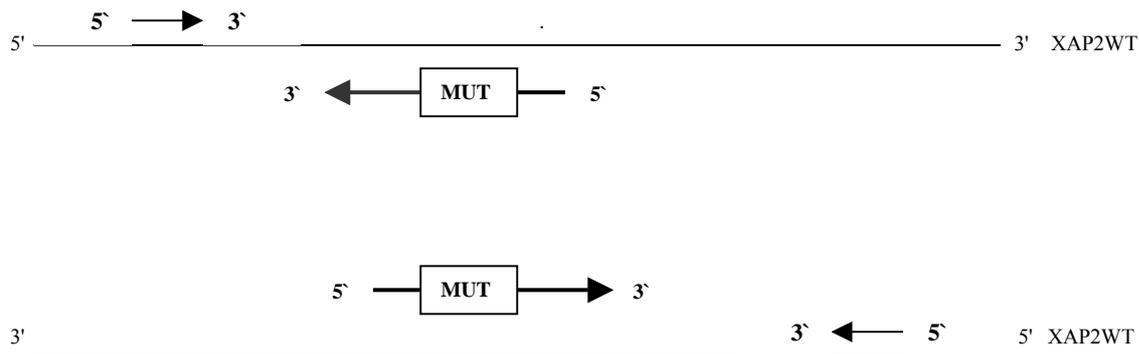
Aufgrund der bereits erwähnten widersprüchlichen Veröffentlichungen wurde in einem ersten Schritt zunächst eine mögliche Interaktion von XAP2 mit hsp90 untersucht. Mittels der Methode der Co-Immunopräzipitation (s. 2.2.8), mit der Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden, konnte eine Bindung von XAP2 mit hsp90 im humanen Zellsystem nachgewiesen werden (Abb. 11). Durch die parallele Untersuchung des Leervektors konnte hierbei ein unspezifisches, methodenbedingtes Artefakt ausgeschlossen werden. Als zweite Kontrolle diente die gleichzeitige Präzipitation von FKBP51, welches sich aufgrund seiner Strukturähnlichkeit und seiner bereits bekannten hsp90-Interaktion hierfür besonders eignet (Abb. 11). Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde die genannte Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt - bei gleichen Ergebnissen - wiederholt. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte daher eine spezifische Interaktion von XAP2 mit hsp90 gezeigt werden. Es ist allerdings anzumerken, dass sich diese Bindung hinsichtlich der verwendeten Puffer oder anderer experimenteller Bedingungen wie der Zentrifugationsgeschwindigkeit deutlich sensibler zeigte als die zu Kontrollzwecken mituntersuchte Bindung von FKBP51 an hsp90. Dies könnte ein Hinweis auf eine unterschiedlich starke Bindung der einzelnen Cofaktoren an hsp90 darstellen und die in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten beim Nachweis der XAP2-hsp90-Interaktion erklären.

3.2.2 Bedeutung der Interaktion mit hsp90 für die XAP2-vermittelte Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivierbarkeit

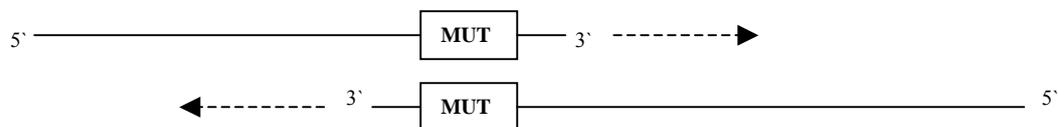
Um die Bedeutung der Interaktion mit hsp90 auf die Funktion von XAP2 im Rahmen der Regulation der Glukokortikoidrezeptoraktivität zu untersuchen, wurden zunächst zwei Punktmutationen im Bereich der TPR-Domäne von XAP2 eingeführt.

Zur Einführung der TPR-Mutation in XAP2 wurden zunächst zwei Polymerase-Ketten-Reaktionen nach folgendem Schema durchgeführt:

1:



2:



3:

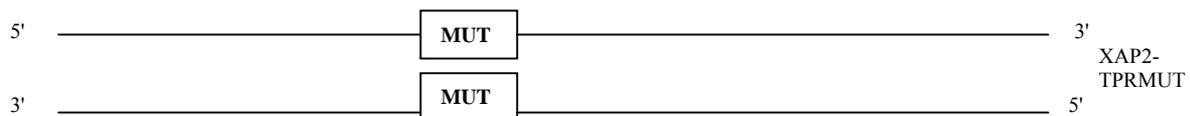


Abb. 10: Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung der XAP2TPR-Mutante

Hierbei wurden zwei Primerpaare, die die gewünschte Mutation der XAP2-TPR-Domäne enthielten, jedoch an den komplementären DNA-Strängen des Ausgangsproduktes annealten, eingesetzt. Hierdurch wurden zwei PCR-Teil-Produkte von XAP2 mit der gewünschten TPR-Mutation amplifiziert. Mittels dieser beiden PCR-Produkte sowie je eines Start- und Endprimers des XAP2-Gens konnte daher in einer weiteren PCR eine Amplifikation eines PCR-Produktes erreicht werden, welches für XAP2 kodierte und die entsprechende TPR-Mutation trug. Dieses konnte nach entsprechendem Restriktionsverdau in einen vorbereiteten Expressionsvektor ligiert werden. Die Einführung der TPR-Mutation in XAP2-FLAG wurde mittels eines Mutagenese-Kits (s. 2.2.2) durchführt.

Die Einführung der Punktmutationen in XAP2 führte auf Proteinebene zum Austausch zweier Aminosäuren im Bereich der dritten TPR-Domäne von XAP2: Austausch des positiv geladenen Lysins an Position 266 sowie des ebenfalls positiv geladenen Arginins an Position 271 jeweils gegen das ungeladene Alanin. Diese Mutation erfolgte in Analogie zu den veröffentlichten TPR-Mutationen von FKBP51 sowie PP5 (Serin/Threonin Protein Phosphatase 5) (Russel et al., 1999; Wochnik et al., 2005) sowie in Anlehnung an die hinsichtlich XAP2 bereits veröffentlichten Mutationsexperimente (Bell et al., 2000). Der über die von Bell beschriebene Mutation hinausgehende zusätzliche zweite Aminosäureaustausch bei XAP2 erfolgte hierbei, um eine möglichst vollständige Aufhebung der hsp90-Bindung im Bereich dieser TPR-Domäne zu gewährleisten ohne eine größere Strukturänderung des Proteins zu bewirken, wie es sicherlich eine Deletion der gesamten TPR-Domäne zur Folge hätte. Hiermit sollte das Risiko, dass eine Einzelmutation die Bindung von XAP2 an hsp90 zwar stark abschwächt (möglicherweise auch unter die Nachweisgrenze der Methode einer Immunopräzipitation), aber nicht völlig aufhebt und damit Einfluss auf die nachfolgend erhobenen Funktionsdaten nimmt, verringert werden.

Die so hergestellte TPR-Mutante von XAP2 wurde im gleichen experimentellen Ansatz wie das Wildtyp-Protein im Rahmen der bereits beschriebenen Co-Immunopräzipitation (s. 2.2.8) untersucht. Bei vergleichbarem Expressionsniveau der beiden Proteine war jedoch keine Interaktion der XAP2TPRMutante mit hsp90 nachweisbar (Abb. 11).

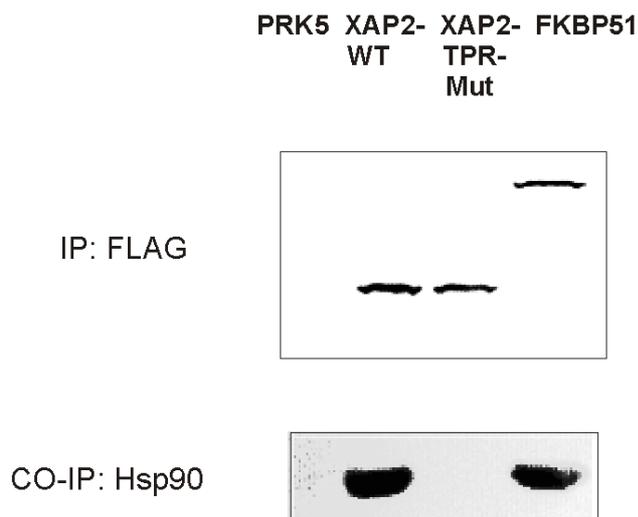


Abb. 11: Zwei Punktmutationen in der TPR-Domäne von XAP2 inhibieren die Bindung an hsp90

Westernblot einer Immunpräzipitation mit anti-FLAG gekoppelten Partikeln. HEK 293-Zellen wurden zunächst mit 10 µg/Ansatz der FLAG-fusionierten Varianten von XAP2, XAP2TPRmut, FKBP51 oder PRK5SV40 transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Lyse der Zellen der unterschiedlichen Ansätze sowie die Inkubation der Lysate mit anti-FLAG gekoppelten Agarose“beads“. In einem nächsten Schritt wurden die an die Agarose gebundenen Proteine von den Trägerbeads wieder gelöst und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Im Weiteren wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt, die Membran dann zunächst mit einem hsp90-Antikörper inkubiert, um eine hsp90-Bindung der getesteten Proteine zu untersuchen. Anschließend wurde die Membran mit FLAG-Antikörper behandelt, um die Effizienz der Präzipitation zu kontrollieren.

Um eine mögliche Bedeutung der Aufhebung der hsp90-Interaktion für die Regulation der Aktivität des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 zu testen, wurde die XAP2TPRMutante unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie das XAP2WT-Protein (s. 3.1.2) untersucht. Zur Kontrolle der experimentellen Bedingungen wurde in den Experimenten parallel jeweils auch der Basiseffekt durch XAP2WT in mindestens einer Dosierung mit überprüft. Im Rahmen der hier dargestellten Funktionsuntersuchungen zeigte die XAP2TPRMutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors mehr (Abb. 12A). Der Anstieg der exprimierten Mengen der XAP2TPRMutante sowie die Vergleichbarkeit der Expressionsniveaus zwischen Mutante und Wildtyp konnten in einer Westernblotanalyse bestätigt werden (Abb. 12B, C, D, E). Damit konnte gezeigt werden, dass die dritte TPR-Domäne von XAP2 eine essentielle Bedeutung bei der Regulation bzw. Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivität durch das Protein hat. Zwar kann hiermit die Frage nach möglichen anderen Interaktionsstellen in XAP2 diesbezüglich nicht beantwortet werden, falls vorhanden, sind diese alleine jedoch nicht ausreichend für den inhibitorischen Effekt auf den GR.

Wie unter 3.1.3 bereits erwähnt, lässt der Vergleich der beiden jeweils in der TPR-Domäne mutierten Proteine XAP2TPRmut und FKBP51TPRmut vermuten, dass es sich bei der leichten Tendenz zur GR-Inhibition bei der höchsten eingesetzten Plasmidmenge um einen unspezifischen Effekt handelt.

In einem zusätzlichen Schritt wurde, an die Funktionsuntersuchungen von FKBP51WT (Abb.5) anknüpfend, der von Wochnik et al. (2005) bereits beschriebene Effekt der TPR-Mutation von FKBP51 auf die Rezeptoraktivität wiederholt (Abb. 12D). Hiermit konnten nicht nur die Güte des verwendeten experimentellen Settings, sondern auch die funktionellen Parallelen der TPR-Proteine XAP2 und FKBP51 nachgewiesen werden.

Mit den dargestellten Untersuchungen konnte zum einen eine Interaktion von XAP2 und hsp90 bestätigt werden. Durch die Untersuchung der TPR-Mutante von XAP2 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Austausch zweier Aminosäuren der dritten TPR-Domäne von XAP2 nicht nur zu einer Aufhebung der Bindung an hsp90, sondern auch zu einer Aufhebung der Inhibition der Glukokortikoidrezeptoraktivität führt, was auf die zentrale Bedeutung dieser Interaktion bei der XAP2-induzierten Inhibition des GR hinweist.

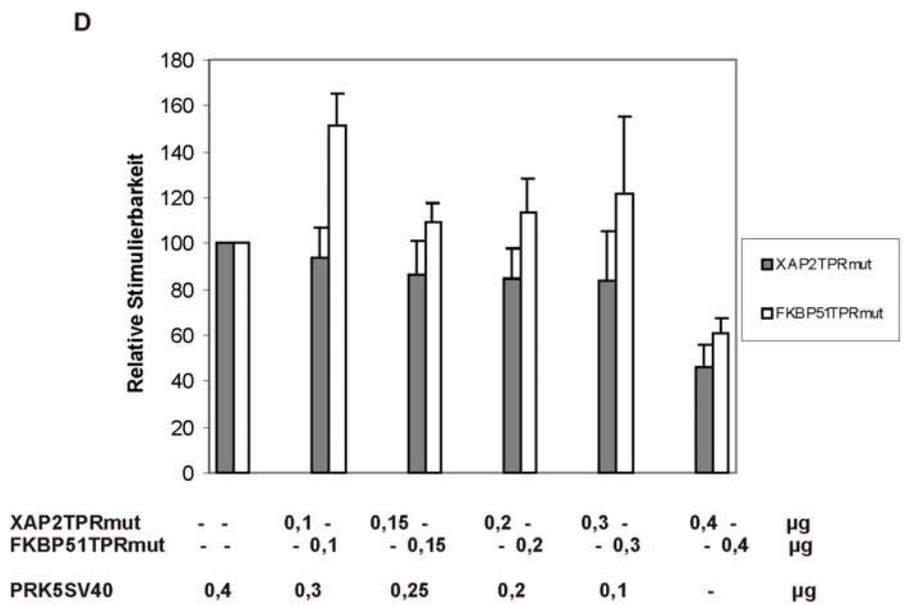
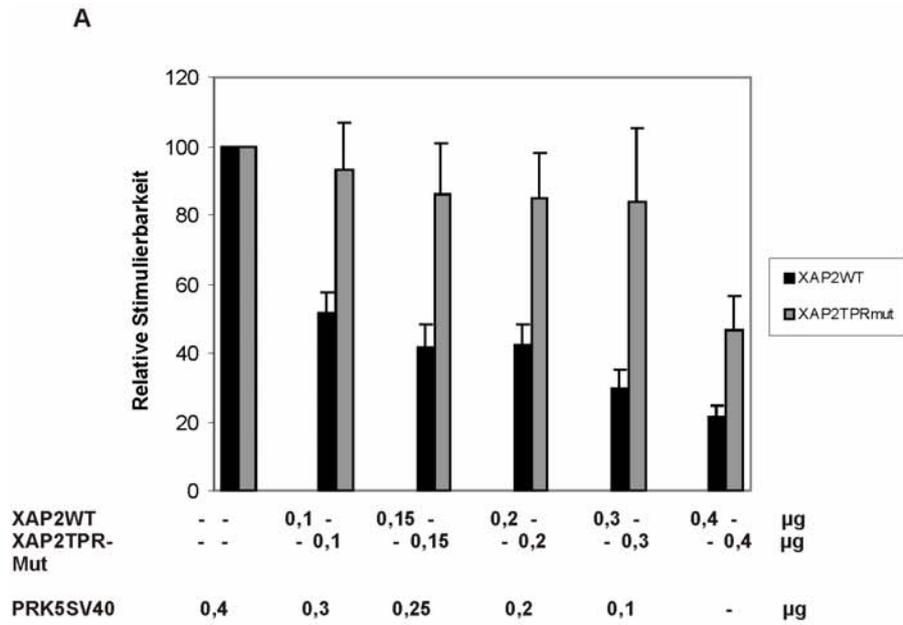


Abb. 12: Notwendigkeit der Interaktion mit hsp90 für die XAP2-vermittelte Inhibierung der GR-Aktivität

A: Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2TPRmut.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well), PRK7-GR (0,025 µg/well) sowie FLAG-XAP2WT oder FLAG-XAP2TPRmut bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) von jeweils 7 unabhängigen Experimenten (Mittelwerte XAP2WT: 100; 51; 42; 42; 29; 21; Mittelwerte XAP2TPRmut: 100; 93; 86; 85; 84; 46) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 XAP2WT: 0; 6; 6; 6; 6; 3; Standardabweichung/2 XAP2TPRmut: 0; 14; 15; 13; 21; 10).

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Transfektion der verschiedenen Mengen an XAP2TPRmut im Vergleich zur Referenzbedingung. Signifikanz 0,1 µg XAP2TPRmut: 0.12794; 0,15 µg XAP2TPRmut: 0.10642; 0,2 µg XAP2TPRmut: 0,16264; 0,3 µg XAP2TPRmut: 0.05808; 0,4 µg XAP2TPRmut: 0.19301.

B: Repräsentative Westernblotanalyse des FLAG-Getaggten XAP2TPRmut-Proteins. Hierfür wurden die Proben eines repräsentativen Experimentes der unter B gezeigten Reihe nach der Durchführung der Reportergenassays auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Immunoblotting das FLAG-getaggte Protein detektiert.

C: Aktinkontrolle der unter B dargestellten Westernblotanalyse. Hierzu wurde auf der gleichen Nitrozellulosemembran neben dem Nachweis des FLAG-getaggten Proteins auch Aktin detektiert.

D: Vergleich der Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors unter der Transfektion ansteigender Mengen von XAP2TPRmut bzw. FKBP51TPRmut.

SK-N-MC-Zellen wurden unter Verwendung von kationischem polymerischem Transfektionsreagenz in Mikrotiterplatten mit MTV-Luc (0,04 µg/well bzw. Untersuchungsansatz), pCMV-Gaussia-Luciferase (0,03 µg/well bzw. Untersuchungsansatz), PRK7-GR (0,025 µg/well bzw. Untersuchungsansatz) sowie FLAG-XAP2TPRmut oder FLAG-FKBP51TPRmut bzw. PRK5SV40 in den angegebenen Mengen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16h mit 10 nM Cortisol bzw. Ethanol inkubiert, anschließend erfolgte die Messung der Luciferase- und Gaussia-Luciferase-Aktivität. Dargestellt sind die Stimulierbarkeiten des GR als Mittelwerte (arithmetische Mittel) aus 3 (FKBP51TPRmut) bzw. 7 (XAP2TPRmut) unabhängigen Experimenten (Mittelwerte FKBP51TPRmut: 100; 152; 109; 113; 122; 61; Mittelwerte XAP2TPRmut: 100; 93; 86; 85; 84; 46) sowie die Standardabweichung/2 (Standardabweichung/2 FKBP51TPRmut : 0; 14; 9; 15; 34; 7; Standardabweichung/2 XAP2TPRmut: 0; 14; 15; 13; 22; 10).

E: Repräsentative Westernblotanalyse der FLAG-getaggten Versionen von XAP2- und XAP2TPRmut-Protein. Hierfür wurden die Proben eines repräsentativen Experimentes, bei dem XAP2 sowie die XAP2TPRMutante in gleichen Mengen (je 0,2 µg/Ansatz) transfiziert wurden, nach Durchführung der Funktionsassays aufgetragen.

F: Aktinkontrolle der unter E dargestellten Westernblotanalyse. Hierzu wurde auf der gleichen Nitrozellulosemembran neben dem Nachweis des FLAG-getaggten Proteins auch Aktin detektiert.

3.3 Einfluss von XAP2 auf die intrazelluläre Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors

Wie gezeigt werden konnte, inhibiert XAP2 spezifisch die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors. Es stellt sich daher die Frage, auf welche Weise XAP2 zu einer hsp90-vermittelten Inhibition der Rezeptoraktivität führen kann. Eine zu prüfende Frage in diesem Zusammenhang ist die eines möglichen XAP2-vermittelten Einflusses auf die intrazelluläre Verteilung des Rezeptors. Nicht zuletzt ist ein Effekt des TPR-Proteins FKBP51 auf die Translokation des GR bereits bekannt; darüber hinaus nehmen auch die Untersuchungen zu einem XAP2-vermittelten Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des AhRezeptors in Anwesenheit wie Abwesenheit von Liganden einen wesentlichen Platz im Rahmen der Literatur zu XAP2 ein (Kazlauskas et al., 2000; Petrusis et al., 2000).

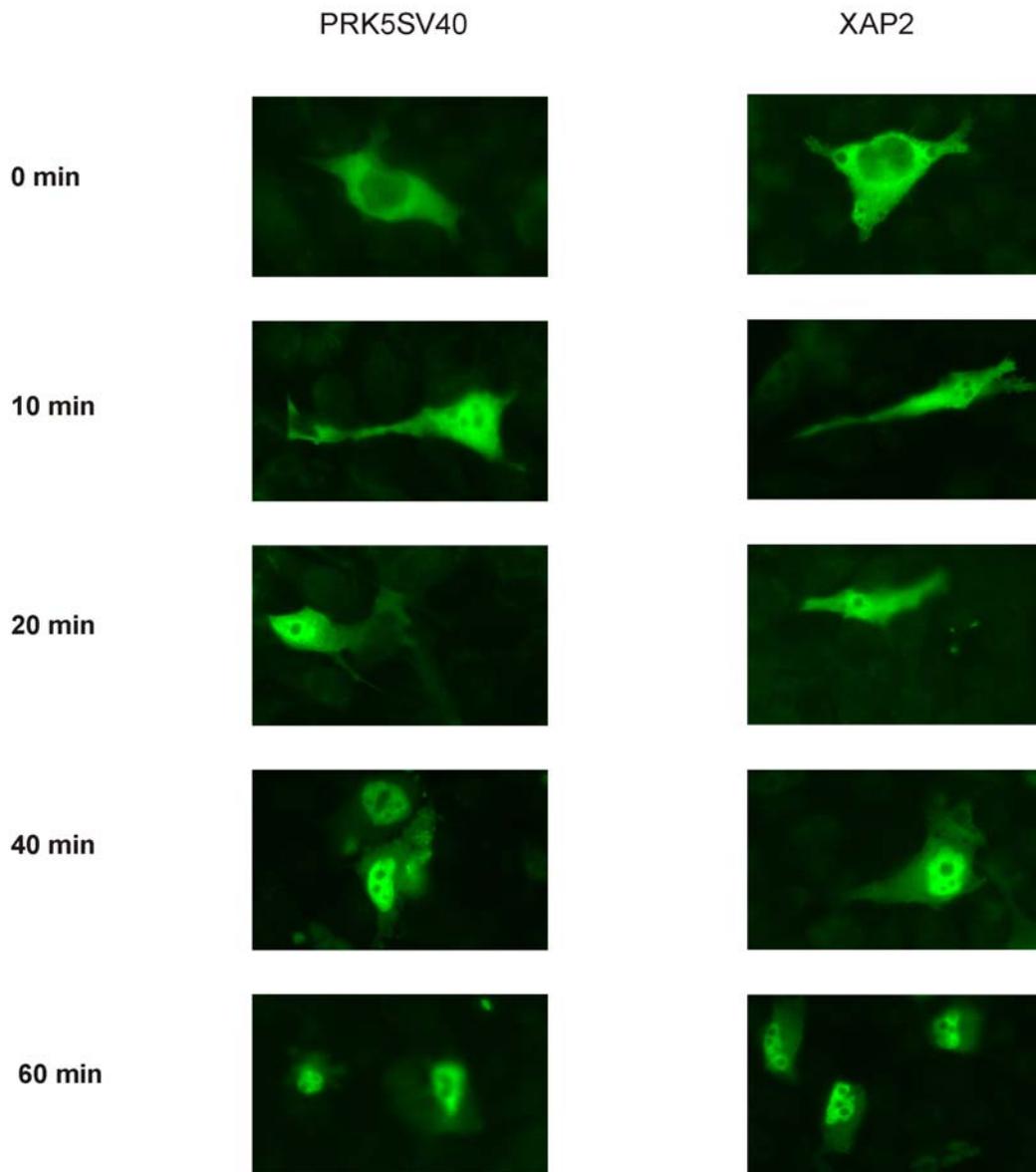
Die Frage nach einem möglichen Effekt von XAP2 auf die intrazelluläre Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. 2.2.9) untersucht. Hierbei wurde ein mit GFP (green fluorescence protein)- fusionierter Glukokortikoidrezeptor verwendet, der in HeLa-Zellen transfiziert wurde. HeLa-Zellen eignen sich aufgrund ihrer Größe, der Größe ihres Zellkerns sowie der deutlichen Abgrenzung von zytoplasmatischem zu nukleärem Zellkompartiment für eine mikroskopische Untersuchung besonders gut. Um zu untersuchen, ob XAP2 einen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des GR hat, wurde zusätzlich zu dem GFP-GR kodierenden Plasmid auch XAP2-Plasmid bzw. Leervektor in die Zellen transfiziert. Die Untersuchungsansätze mit dem Leervektor PRK5SV40 erfolgten hierbei als Kontrollbedingungen für die Transfektionen mit XAP2. Dies erfolgte zum einen, um einen etwaigen z.B. durch den Vorgang der Transfektion hervorgerufenen Effekt auf das Translokationsverhalten des Rezeptors ausschließen zu können, zum anderen dienten diese Untersuchungsansätze als Referenzwerte für die Transfektionen mit XAP2. Die Transfektion erfolgte mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz, da dies etwa im Gegensatz zur Elektroporation die Morphologie der transfizierten Zellen in geringerem Masse beeinflusst. Nach der Transfektion wurden die Zellen der unterschiedlichen Untersuchungsansätze für eine definierte Zeitspanne (10, 20, 40 oder 60 min) mit Cortisol oder nur mit dem Lösungsmittel Ethanol (Referenzansätze) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch, wobei die Zellen je nach vorliegender Verteilung der Fluoreszenz nach Kazlauskas et al. (2000) in eine von 5 Kategorien eingeteilt wurden:

0	C	ausschließlich zytoplasmatische Verteilung
1	C>N	überwiegend zytoplasmatische Verteilung
2	C=N	äquivalente Verteilung auf Nukleus und Zytoplasma
3	N>C	überwiegend nukleäre Verteilung
4	N	ausschließlich nukleäre Verteilung

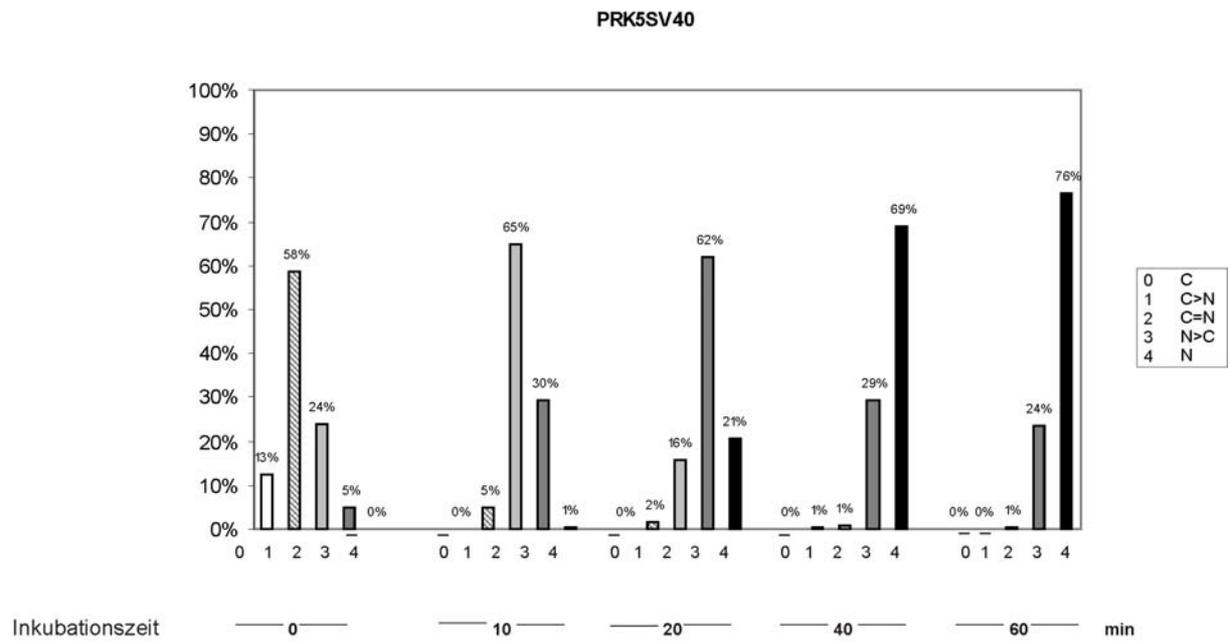
Die Einteilung der Zellen in die genannten Kategorien aufgrund des fluoreszenzmikroskopischen Verteilungsmuster erfolgte verblindet durch einen qualifizierten und unabhängigen Auswerter.

Für jeden der 10 Untersuchungsansätze (0, 10, 20, 40 oder 60 min Hormoninkubation, jeweils in Anwesenheit von XAP2 oder Leervektor) wurden zwischen 167 und 193 Zellen ausgewertet. Das arithmetische Mittel der kategorisierten Zellen pro experimenteller Bedingung betrug 183.

A



B



C

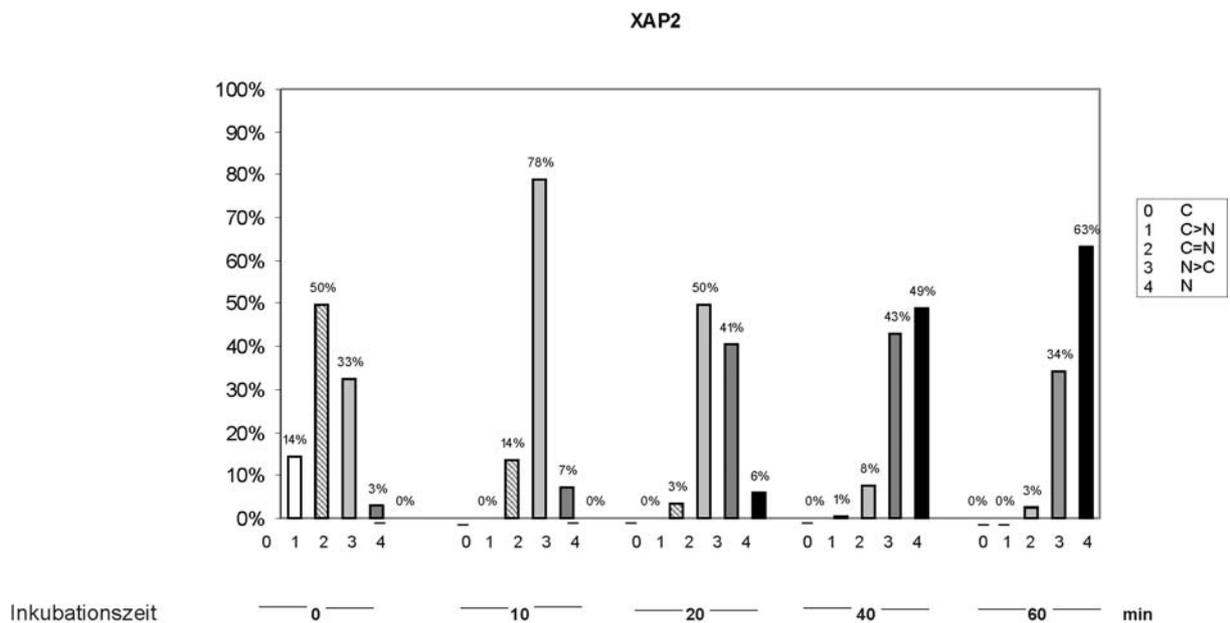


Abb. 13: Zeitabhängiger Effekt von XAP2 auf die intrazelluläre Lokalisation des GR

A: Darstellung repräsentativer Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der einzelnen unter B bzw. C beschriebenen Untersuchungsansätze.

B: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzlokalisierung der Transfektion mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz von HeLa-Zellen mit GFP-Glukokortikoidrezeptor (0,25

µg/Ansatz) und Leervektor PRK5SV40 (0,75 µg/Ansatz) unter Inkubation mit Cortisol (10 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte (arithmetische Mittel) der Fluoreszenzverteilung des Glukokortikoidrezeptors als prozentuale Verteilung der ausgewerteten Zellen auf die beschriebenen Fluoreszenzkategorien (0;1;2;3;4) für jeden Untersuchungsansatz (0, 10, 20, 40, 60 min Inkubationszeit mit Cortisol).

C: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzlokalisierung der Transfektion mit kationischem polymerischem Transfektionsreagenz von HeLa-Zellen mit GFP-Glukokortikoidrezeptor (0,25 µg/Ansatz) und FLAG-XAP2 (0,75 µg/Ansatz) unter Inkubation mit Cortisol (10 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte (arithmetische Mittel) der Fluoreszenzverteilung des Glukokortikoidrezeptors als prozentuale Verteilung der ausgewerteten Zellen auf die beschriebenen Fluoreszenzkategorien (0;1;2;3;4) für jeden Untersuchungsansatz (0, 10, 20, 40, 60 min Inkubationszeit mit Cortisol).

Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigte sich bei Cotransfektion des Leervektors ohne Hormonzugabe zunächst eine überwiegende, wenn auch nicht ausschließliche zytoplasmatische Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors. Die Zugabe von Hormon führte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu einer vermehrt nukleären Detektion des Rezeptors. Nach der bei dem vorliegenden Experiment maximalen Inkubationszeit von 60 min ließ sich der Rezeptor nahezu ausschließlich im Kernkompartiment der transfizierten Zellen nachweisen (Abb. 13A,B). Der beobachtete zeitliche Verlauf der Translokation des Glukokortikoidrezeptors entspricht daher dem erwarteten Lokalisationsverhalten eines nukleären Rezeptors und stellt ein Gütekriterium der verwendeten Untersuchungsmethode dar.

Bei der gleichzeitigen Transfektion von XAP2 zeigte sich ohne Zugabe von Hormon im Vergleich zu der entsprechenden Untersuchungsbedingung mit PRK5SV40 kein wesentlicher Unterschied in der Lokalisation des GR. Bei steigenden Inkubationszeiten mit Hormon zeigte sich auch bei der Transfektion mit XAP2 eine zunehmende Kernlokalisierung des Rezeptors, diese war im Vergleich zu den Referenzbedingungen mit PRK5SV40 jedoch schwächer. Besonders deutlich waren die Unterschiede in der nukleären Lokalisation des GR hierbei bei Inkubationszeiten von 10 bis 40 min. Im Bereich der maximalen Inkubationsdauer von 60 min näherte sich die Verteilung des Rezeptors unter XAP2 der Referenzbedingung wieder an (Abb. 13A,C).

Wie gezeigt werden konnte, hat XAP2 zu den untersuchten Zeitpunkten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des GR in Abwesenheit eines Liganden. In Anwesenheit von Hormon führt das TPR-Protein jedoch zunächst zu einer deutlichen Reduktion der Akkumulation im Kern, wie sie von einem nukleären Rezeptor eigentlich zu erwarten wäre – im Bereich längerer Inkubationszeiten mit Liganden zeigte sich dieser Effekt jedoch deutlich rückläufig.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Frage nach einem möglichen Einfluss des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 (XAP2) auf den Glukokortikoidrezeptor untersucht. Zur Validierung der hierzu verwendeten Methode der Transfektion mit anschließender Durchführung von Rezeptorgenassays wurde diese in einem ersten Schritt mittels zweier Proteine (FKBP51, FKBP52), die sowohl über eine große strukturelle Ähnlichkeit mit XAP2 als auch einen bereits gut untersuchten Effekt auf die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors verfügen, getestet. Bei den im Anschluss durchgeführten Experimenten mit Überexpression von XAP2 zeigte sich, dass dieses die Aktivierbarkeit, d.h. die Transkriptionsaktivität des Glukokortikoidrezeptors dosisabhängig inhibiert; dieser Effekt erwies sich bei allen untersuchten XAP2-Konzentrationen als statistisch signifikant bzw. sehr signifikant. Die Inhibierung des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 zeigte sich bei allen untersuchten humanen Zelllinien (darunter eine Zelllinie neuronalen Ursprungs) und Transfektionsmethoden.

Hinsichtlich des dem beobachteten Effekt zugrundeliegenden Mechanismus wurden verschiedene Aspekte untersucht. Es wurde zunächst eine unspezifische bzw. methodenabhängige Hemmung der Rezeptoraktivität - bedingt durch Menge und Art der transfizierten Plasmide oder den Transfektionsvorgang an sich - ausgeschlossen. Dies erfolgte durch parallele Transfektionen von Plasmiden, die keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivität erwarten ließen - besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang neben FKBP52 und FKBP51TPRMut die TPRmutierte Variante von XAP2 selbst, die sich lediglich in zwei Aminosäuren vom Wildtypprotein XAP2 unterscheidet. In den Funktionsuntersuchungen zeigten diese Proteine jedoch bei der maximal transfizierten Plasmidmenge eine vom untersuchten Plasmid unabhängige Hemmung der Rezeptoraktivität. Eine mögliche Erklärung ist ein durch sehr hohe Mengen an transfiziertem Plasmid hervorgerufenes Überschreiten der Transkriptionskapazität der Zellen mit reduzierter Transkription von Rezeptor- und Reportergenplasmiden. Dieser Aspekt muss daher bei Transfektionen sehr hoher Gesamtplasmidmengen berücksichtigt werden.

Bei allen anderen untersuchten experimentellen Bedingungen ergab sich jedoch kein Hinweis auf eine methodenabhängige Hemmung des Rezeptors als mögliche Ursache des XAP2-vermittelten Effektes, was die Güte der Ergebnisse bestätigt. Es ergab sich weiter kein Hinweis auf eine Erhöhung des Glukokortikoidrezeptorabbaus unter XAP2 - wie dies etwa vom GR-Cofaktor CHIP bekannt ist (Connell et al., 2001).

Die in einem weiteren Schritt erfolgte Untersuchung des XAP2-Effektes auf den Glukokortikoidrezeptor bei verschiedenen Hormonkonzentrationen zeigte eine deutliche Abnahme der Inhibierung der GR-Aktivierbarkeit bei zunehmenden Hormonkonzentrationen. Die XAP2-vermittelte Inhibition des GR ist also am stärksten unter subsaturierten Bedingungen, d.h. Hormonkonzentrationen, bei denen eine Sättigung der Rezeptoren mit Hormon nicht zu erwarten ist und lässt sich zumindest teilweise durch einen Überfluss an Liganden abschwächen. Ein solches Verhalten stellt einen starken Hinweis auf eine durch XAP2 vermittelte Beeinträchtigung der Hormonbindungsaffinität des Glukokortikoidrezeptors dar, die sich durch einen Hormonüberfluss zumindest teilweise kompensieren lässt. Da nach der vorherrschenden Lehrmeinung nukleäre Rezeptoren wie der GR in hormonungebundenem Zustand zunächst im Zytoplasma vorliegen und nach der Ligandenbindung in den Zellkern translozieren (Brinkmann, 1994), stellte sich die Frage, ob die beobachtete Hemmung der Ligandenbindungsaffinität des GR durch XAP2 letztlich zu einer Hemmung des Rezeptortransportes in den Nukleus führt und damit den der XAP2-vermittelten Hemmung der GR-Aktivität zugrundeliegenden Mechanismus darstellt.

Diese Fragestellung wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit mittels fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Lokalisation entsprechend markierter Rezeptoren bei gleichzeitiger Transfektion von XAP2 bzw. Kontrollvektor untersucht. Hierbei zeigte der Glukokortikoidrezeptor bei Cotransfektion von XAP2 im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Zugabe von Hormon keine wesentlichen Unterschiede im Lokalisationsverhalten. Beide Untersuchungsansätze wiesen unter dieser Bedingung eine hauptsächlich, wenn auch nicht ausschließliche zytoplasmatische Lokalisation auf. Bei Zugabe von Hormon ließ sich zu den verschiedenen Messzeitpunkten bei den Kontrollzeitproben die erwartete rasch zunehmende nukleäre Lokalisation des Rezeptors beobachten. Bei den Untersuchungsansätzen mit XAP2 zeigte sich dieser Effekt zunächst deutlich reduziert, näherte sich nach etwa 1 h jedoch den Kontrollproben wieder weitgehend an. XAP2 führt somit unter Ligandengabe kurzfristig zu einer deutlich stärkeren zytoplasmatischen Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors – offenbar jedoch nicht zu einer längerfristigen Behinderung der Kerntranslokation des Rezeptors. Dies scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnissen der Reporterassays zu stehen.

Viele der Cofaktoren des Glukokortikoidrezeptors liegen in einem Heterokomplex vor, der auch das heat shock protein 90 (hsp90) als zentralen Bestandteil enthält (Brinkmann, 1994; Pratt et al., 1997). Einige dieser Chaperone weisen wie auch XAP2 eine oder mehrere TPR-Domänen auf und interagieren über diese mit dem heat shock protein. Da unter anderem bei den Cofaktoren FKBP51 und PP5 gezeigt werden konnte, dass diese Interaktion eine wesentliche Voraussetzung für die Regulation der Rezeptoraktivität durch diese TPR-Proteine darstellt (Russell et al., 1999; Wochnik et al., 2005), ist dieser Aspekt ein weiterer zentraler Punkt bei der Untersuchung des XAP2-vermittelten Effektes auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors.

Eine Interaktion von XAP2 mit hsp90 zeigte sich bisher in der Literatur noch nicht ausreichend geklärt: Obgleich mehrere Autoren eine Interaktion zwischen hsp90 und XAP2 bestätigen (Ma et al., 1997; Meyer et al., 1999/2000; Bell et al., 2000; Hollingshead et al., 2004), liegen auch Veröffentlichungen vor, die über Schwierigkeiten oder mangelnden Erfolg beim Nachweis dieser Bindung, insbesondere ohne gleichzeitige Transfektion des untersuchten AhRezeptors (Carver et al., 1997; Meyer et al., 1998; Kazlauskas et al., 2002) berichteten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst unter Verwendung der Methode der Immunpräzipitation eine Interaktion von XAP2 und hsp90 ohne Cotransfektion eines Rezeptors bestätigt werden. Allerdings zeigte sich diese Bindung etwa im Vergleich zu der zu Kontrollzwecken mitgeführten Präzipitation von hsp90 und FKBP51 wesentlich sensibler gegenüber vielen Parametern z.B. der Zentrifugationsgeschwindigkeit und dem verwendeten Waschpuffer. Zum einen konnte bei Experimenten mit höheren Zentrifugationsgeschwindigkeiten als 8000 rpm zwar weiterhin eine Interaktion zwischen hsp90 und FKBP51, eine Bindung von XAP2 an hsp90 jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei der Verwendung von TBST anstatt des Lysispuffers A' zu Waschzwecken. Mögliche in diesem Zusammenhang zu diskutierende Faktoren stellen hierbei der etwas differierende pH-Wert der Lösungen oder die Verwendung von Molybdat dar, von dem ein Einfluss auf die hsp90-Konformation bereits bekannt ist (Sullivan et al., 2002). Dies könnte einen Hinweis auf eine im Vergleich zu den anderen TPR-Cofaktoren schwächere oder zumindest unterschiedliche Bindung des TPR-Proteins XAP2 an hsp90 darstellen und die in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten beim Nachweis dieser Interaktion erklären.

Um die Bedeutung der TPR-Domänen von XAP2 für die Interaktion mit hsp90 bzw. für den inhibierenden Effekt auf den GR zu untersuchen, wurde das XAP2-Wildtyp-Protein zunächst an zwei Positionen in der dritten TPR-Domäne so punktmutiert, dass die entstandene XAP2TPRMutante im Bereich der dritten TPR-Domäne zwei veränderte Aminosäuren

aufwies. Die Mutationen erfolgten in Analogie zu den aus der Literatur bekannten TPR-Mutationen von FKBP51 bzw. PP5 (Russell et al., 1999; Wochnik et al., 2005). Das so veränderte XAP2-Protein zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine Bindung an hsp90. Diese Beobachtung konnte die Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen zu dieser Frage bestätigen (Meyer et al., 2000; Bell et al., 2000). In den anschließend durchgeführten Funktionsuntersuchungen zeigte die XAP2TPRMutante im Vergleich zum Wildtypprotein keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors mehr. Diese Ergebnisse belegen daher nicht nur die wesentliche Bedeutung der TPR-Domäne bzw. der charakteristischen Aminosäuren für die Interaktion von Xap2 und hsp90, sondern insbesondere auch die Notwendigkeit dieser Interaktion für die Inhibition der GR-Aktivität durch XAP2. Wenngleich die durchgeführten Untersuchungen weitere Interaktionsstellen innerhalb von XAP2 mit hsp90 (Meyer et al., 1999; Kazlauskas et al., 2002) nicht ausschließen können, so zeigen sie doch noch einmal deutlich, dass etwaige zusätzliche Interaktionsstellen ohne eine intakte dritte TPR-Domäne von XAP2 nicht ausreichend für eine Interaktion mit hsp90 und somit eine Gewährleistung des regulativen Effektes von XAP2 auf den Glukokortikoidrezeptor waren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen erstmals eine Beteiligung des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 an der Signaltransduktion des Glukokortikoidrezeptors in Säugetierzellen, die statistisch signifikant nachgewiesen werden konnte und widerlegen damit die These, dass XAP2 spezifisch den AhR reguliert (LaPres, 2000). Die beobachtete Inhibition des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 in humanen Zellen steht dabei nur auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnissen von Carver et al. (1998), die im Hefesystem keine XAP2-vermittelte Beeinflussung des GR beobachtet hatten. Das Hefesystem unterscheidet sich in grundlegenden Aspekten von Säugetierzellen – so weisen Hefen etwa keine Steroidrezeptoren auf und zeigen wesentliche Unterschiede in Expression und Zusammensetzung von Cofaktoren im Bereich der großen TPR-Proteine (Riggs et al., 2003). Daher erlauben die Ergebnisse von Funktionsexperimenten im Hefesystem nur bedingt Rückschlüsse auf Säugetiersysteme. So sind auch (scheinbar) divergente Effekte beim Vergleich beider Systeme bei der Untersuchung anderer GR-Cofaktoren wie FKBP51 und FKBP52 bekannt (Riggs et al., 2003; Wochnik et al., 2005). Im Vergleich mit anderen GR-regulierenden Cofaktoren positioniert sich XAP2 ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit in unmittelbarer Nähe zu den TPR-Proteinen FKBP51 und FKBP52: Während XAP2 deutliche Strukturähnlichkeit mit letztgenanntem Protein aufweist, zeigt sich sowohl in den Funktionsuntersuchungen des Wildtyp- und TPRmutierten XAP2-Proteins wie auch in den Translokationsuntersuchungen eine Ähnlichkeit mit FKBP51 (Wochnik et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eine Hemmung des Glukokortikoidrezeptors durch XAP2 in verschiedenen Punkten. Es erscheint in diesem Zusammenhang wenig wahrscheinlich, dass die eher kurzfristige Hemmung der Kernakkumulation des GR durch XAP2 die mit einer Einschränkung der Hormonbindungsfähigkeit einhergehende Hemmung der Rezeptoraktivität nach 16stündiger Inkubationszeit hinreichend erklären kann. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass XAP2 einen hemmenden Effekt auf den Rezeptor auf verschiedenen Ebenen, möglicherweise in verschiedenen Zellkompartimenten ausübt. Entgegen der lange vorherrschenden Lehrmeinung der ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation der Cofaktoren (Young et al., 2004) erscheint auch eine Lokalisation im Kern bzw. ein Transport in den Kern von XAP2 aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der geringen Größe des Proteins wahrscheinlich. Unterstützt wird diese Überlegung durch Arbeiten, die entgegen den Untersuchungen einer der Erstbeschreiber zumindest unter

bestimmten Bedingungen einen Nachweis von XAP2 im AhR-Heterokomplex führen könnten (Ma et al., 1997; Dull et al., 2002; Ramadoss et al., 2004). Weitere Untersuchungen hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation unter den Bedingungen der Funktionsassays könnten diese Hypothese prüfen.

Mit Blick auf die Ergebnisse der Translokationsuntersuchungen stellt sich zudem die Frage nach dem der Verzögerung der nukleären Akkumulation durch XAP2 zugrundeliegenden Mechanismus. Hier muss grundsätzlich unterschieden werden, ob die Hemmung der Kernakkumulation auf einer Hemmung des Rezeptorimportes oder einer Beschleunigung des Exportes des GR aus dem Kern ins Zytoplasma oder einer Kombination beider Möglichkeiten beruht. Ein wichtiger weiterführender Untersuchungsaspekt wäre z.B., ob XAP2 ebenso wie FKBP51 eine Disruption des GR-Heterokomplexes mit dem Motorprotein Dynein induziert (Wochnik et al., 2005). Während der XAP2-vermittelte Effekt auf die Translokation des GR dem von FKBP51 (Wochnik et al., 2005) ähnelt, unterscheidet er sich offenbar in wesentlichen Punkten von dem auf die intrazelluläre Lokalisation des AhR. So scheint der AhRezeptor unter dem Einfluss von XAP2 nicht nur eine langfristige Reduktion der Kernakkumulation, sondern auch einen Effekt auf den AhR in Abwesenheit eines Liganden im Sinne einer noch ausschließlicheren zytoplasmatischen Lokalisation des Rezeptors auszuüben (Kazlauskas et al., 2000; Petrusis et al., 2000). Der zugrundeliegende Mechanismus ist hierbei jedoch offenbar noch nicht geklärt. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang u.a. eine XAP2-bedingte verstärkte Assoziation des Rezeptors mit Aktin- und Tubulin-Komponenten des Zytoskeletts ebenso wie eine Beeinträchtigung des Importes in den Kern über eine Hemmung von Importin β und ein verstärkter Export aus dem Nukleus über das CRM1-System (Kazlauskas et al., 2001; Petrusis et al., 2003; Ramadoss et al., 2004). Auch die Untersuchung dieser Aspekte wäre im Falle des GR trotz des sich unterscheidenden Effektes sicher notwendig.

Der Vergleich des Translokationsverhaltens von Glukokortikoid- und Ah-Rezeptor unter XAP2 zeigt auch, dass das Hepatitis B Virus X-assoziierte Protein 2 keinen einheitlichen Effekt auf die bisher untersuchten nukleären Rezeptoren aufweist. Umso wichtiger erscheint daher die Untersuchung möglicher XAP2-vermittelter Effekte auf weitere nukleäre Rezeptoren, nicht zuletzt des Mineralokortikoidrezeptors.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind nur ein erster Ansatz zur Klärung der Funktion von XAP2 im Rahmen der Signaltransduktion des GR. Weiter untersucht werden müsste die genaue Funktion von XAP2 im Heterokomplex, z.B. die Frage, ob XAP2 mit anderen TPR-Proteinen um hsp90-Bindung und damit den Einbau in den Heterokomplex kompetiert. Dies könnte durch Funktionsuntersuchungen, bei denen XAP2 mit ansteigenden Mengen FKBP52 cotransfiziert wird, näher beleuchtet werden. Weitere Untersuchungen sind auch hinsichtlich der Frage einer möglichen Peptidyl- Prolyl-Isomerase-Aktivität (PPIase-Aktivität) von XAP2 nötig. Zwar wird das Fehlen einer solchen Aktivität aufgrund der mangelnden FK506-Bindung von XAP2 (Carver et al., 1998) sowie der nur geringen Strukturhomologie der entsprechenden XAP2-Domäne mit den PPIase-Domänen von Immunophilinen von einigen Autoren wie Lees et al. (2003) als gegeben vorausgesetzt, jedoch wurde zur abschließenden Klärung dieser Frage noch keine direkte Messung der Enzymaktivität von XAP2 vorgenommen.

Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde mittels der Methode der Überexpression von Proteinen gewonnen. In diesem Zusammenhang wird gelegentlich eingewendet, dass damit u.U. nicht immer die physiologischen Bedingungen der Zellen widergespiegelt werden können. Dagegen gehalten werden kann, dass eine Überexpression von Proteinen in einigen Fragestellungen derzeit unumgänglich ist, um

zelluläre Systeme in einen definierten Zustand zu bringen und derzeit noch keine Methoden vorliegen, die diese vollständig ersetzen könnten. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf geachtet, Plasmide sowie Liganden in der geringst möglichen Konzentration, die eine Messung der Funktionsdaten erlaubt, einzusetzen. Eine Möglichkeit der Überprüfung dieser Ergebnisse in einem den physiologischen Bedingungen näheren System könnte die Untersuchung eines Zellsystems darstellen, welches endogen sowohl XAP2 als auch den Glukokortikoidrezeptor exprimiert. Eine Veränderung der endogenen Mengen an XAP2 könnte etwa durch das Einbringen von Antisense-RNA erreicht werden. Dies stellt allerdings ebenfalls einen Eingriff in das natürliche Gleichgewicht der Zelle dar. Außerdem wäre zu überprüfen, ob die Signalstärke des endogenen Rezeptors für die Messung der Reporterassays ausreicht.

Beim Studium der Literatur zu XAP2, die sich wie erwähnt zum größten Teil auf Untersuchungen im Zusammenhang mit dem AhR erstreckt, fällt auf, dass sehr viele divergierende, z.T. divergente Untersuchungsergebnisse vorliegen. Dies erstreckt sich bereits auf die grundlegende Frage nach einem XAP2-vermittelten Einfluss auf den AhR: Während zum einen über eine Xap2-induzierte Erhöhung der ligandenaktivierte Transkriptionsaktivität des AhR in Hefe bzw. Säugetierzellen berichtet wurde (Ma et al., 1997; Carver et al., 1998; Meyer et al., 1998; Lees et al., 2003), wurde dies von anderen Autoren nicht bestätigt bzw. hinsichtlich der verschiedenen untersuchten Zelllinien/Organismen und experimentellen Methoden differenziert (Petrulis et al., 2003; Hollingshead, 2004; Ramadoss et al., 2004; Pollenz et al., 2005). Weitere Beispiele für konträre Resultate sind neben den in der vorliegenden Arbeit mehrfach erwähnten Arbeiten zur hsp90-Interaktion von XAP2 aber auch die intrazelluläre Verteilung von XAP2 (Ma et al., 1997; Dull et al., 2002; Ramadoss et al., 2004), eine Beteiligung des Proteins CHIP am Abbau des AhR sowie ein möglicher XAP2-vermittelter Einfluss hierauf (Lees et al., 2003; Pollenz et al., 2005) oder mögliche Mechanismen von XAP2 im Rahmen der Hemmung der Kernakkumulation des AhR etwa durch Hemmung von Importin β (Petrulis et al., 2003; Ramadoss et al., 2004).

Es stellt sich also die Frage nach der Ursache für die auffällig großen Diskrepanzen bzgl. dieser Untersuchungsergebnisse. Eine mögliche Ursache stellt sicher neben der Verwendung unterschiedlicher Methoden, z.B. Transfektion mit Überexpression vs. Untersuchung endogener Proteine etc. der Einsatz von Zellsystemen und Plasmiden/Proteinen unterschiedlicher Spezies dar. Auf die Problematik der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Hefesystem auf Säugetiersysteme wurde bereits hingewiesen. Es liegen jedoch auch starke Hinweise auf grundsätzlich divergierende Resultate beim Vergleich von XAP2 bzw. AhR-Plasmiden verschiedener Säugetierklassen vor (Ramadoss et al., 2004; Pollenz et al., 2005). Dies legt nahe, dass diese Ergebnisse offenbar nicht ohne weiteres speziesübergreifend übertragbar sind. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verwendung verschiedener Zelllinien eine Interferenzvariable darstellt. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Bewertung und Interpretation der verschiedenen Arbeiten und macht zusätzliche Vorarbeiten nötig. Es wurde daher bei der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, humane Zelllinien und Plasmide zu verwenden.

Natürlich kann die Rolle von XAP2 im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend geklärt werden und macht weitere Forschungsarbeit in diesem Gebiet notwendig. So erstreckten sich die experimentellen Bedingungen zur Funktion von XAP2 im GR-Regulationsprozess ausschließlich auf humane Zellsysteme. Die pathophysiologische Bedeutung von XAP2 im Tiermodell der Depression/gesunder Kontrollen oder bei depressiven Patienten/gesunden Probanden wurde nicht untersucht.

Dennoch stellt die hier vorgestellte Entdeckung der Regulation des GR durch XAP2 auf mehreren Ebenen einen wesentlichen ersten Schritt zur Erforschung der pathophysiologischen

Rolle von XAP2 im Bereich der HPA-Achse dar und trägt grundlegend zu einem besseren Verständnis des Glukokortikoidrezeptors und des hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Regelkreislaufes dar. Die vorliegende Arbeit ist somit von Relevanz sowohl für die molekularbiologische Grundlagenforschung als auch für Verständnis, Diagnose und Therapie klinischer Störungsbilder. Ein wichtiges Beispiel hierfür stellen die depressiven Störungen dar. XAP2 könnte durch eine Inhibition der Aktivität des Glukokortikoidrezeptors beteiligt sein an der Dysregulation der HPA-Achse. So könnte eine XAP2-vermittelte Hemmung des GR durch ein fehlendes Feedback trotz ausreichend vorhandener Glukokortikoidkonzentration zu einer vermehrten Sekretion von Vorläuferhormonen wie CRH und ACTH und damit zur Hyperaktivität des HPA-Systems beitragen. Die mögliche Bedeutung der GR-Cofaktoren im Rahmen der Pathophysiologie der depressiven Störungen wird gestützt u.a. von den Ergebnissen von Binder et al. (2004), die über eine Assoziation zwischen SNPs (single-nucleotide polymorphisms), d.h. Polymorphismen des für das TPR-Protein FKBP51 kodierenden Gens sowie dem Ansprechen depressiver Patienten auf eine medikamentöse antidepressive Therapie sowie eine höhere Anzahl depressiver Episoden, berichteten. Dies unterstützt die Bedeutung der Rolle der Cofaktoren in diesem Gebiet. So ist es wichtig zu prüfen, ob eine Assoziation zwischen XAP2-Polymorphismen/Mutationen mit einer veränderten Vulnerabilität oder Therapievoraussetzung für affektive Erkrankungen einhergeht. Ein möglicher pathophysiologischer Zusammenhang könnte hinweisend für die Entwicklung neuer antidepressiver Pharmaka bzw. die Optimierung der Behandlungsmöglichkeiten dieser Patienten sein.

Neben den depressiven Erkrankungen liegen darüber hinaus auch gute Hinweise für weitere psychiatrische und neurologische/neurodegenerative Erkrankungen mit einer wesentlichen pathophysiologischen Rolle der HPA-Achse vor: Bulimia nervosa (Birketvedt et al., 2006); PTSD (de Kloet et al., 2005); MS (Gold et al., 2005) und M. Alzheimer (Bayatti et al., 2005). Eine genauere Untersuchung der daran beteiligten Faktoren, z.B. der GR-Cofaktoren könnte also auch hier zum besseren Verständnis, aber natürlich auch zur besseren Behandlung dieser Erkrankungen beitragen. Unverzichtbar sind jedoch auch mögliche Funktionen von XAP2 abseits des neuroendokrinen Systems der HPA-Achse – z.B. seine Rolle bei viralen Infektionen. Einen ersten Hinweis hierauf stellen bereits die Umstände der ersten Identifikation von XAP2 als Interaktionspartner Inhibitor des Hepatitis B Virus X-Proteins dar (Kuzhandaivelu et al., 1996). Hinweisend könnten in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse zur Bedeutung anderer TPR-Proteine beim intrazellulären Transport von Viren sowie deren Einfluss auf die virale DNA-Synthese sein (Zhao et al., 2006). Eine genauere Untersuchung der Rolle von XAP2 bei der Pathogenese der genannten Erkrankungen sollte nicht zuletzt mit der Hoffnung auf eine Verbesserung der Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankungsbilder, beispielsweise der depressiven Störung erfolgen.

5. Zusammenfassung

Eine Fehlfunktion der HPA-Achse stellt bei vielen Erkrankungen, insbesondere bei den depressiven Störungen einen zentralen Pathomechanismus dar. Einer Fehlfunktion der Kortikosteroidrezeptoren scheint hierbei eine wichtige Bedeutung zuzukommen. Eine umfassende Kenntnis der molekularen Signalwege und Regulationsmechanismen der HPA-Achse und der Kortikosteroidrezeptoren ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für eine genaueres Verstehen der Pathophysiologie dieser Erkrankungen.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass an der Regulation der Kortikosteroidrezeptoren insbesondere des Glukokortikoidrezeptors eine Vielzahl an Cofaktoren beteiligt ist, die man zusammen als hsp90-GR-Heterochaperonkomplex bezeichnet. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht daher die Frage nach einer möglichen Beteiligung bzw. Funktion des Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein 2 (XAP2) in diesem Komplex. Diese Fragestellung fußt zum einen darauf, dass XAP2 Strukturhomologie zu anderen TPR-Proteinen zeigt, deren Beteiligung an diesem Regulationskomplex bereits beschrieben wurde, zum anderen auf Forschungsergebnissen, die über vielfältige Effekte von XAP2 auf einen anderen nukleären Rezeptor, den AhRezeptor berichteten.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass XAP2 die Aktivierbarkeit des Glukokortikoidrezeptors in humanen Zellen inhibitorisch beeinflusst – im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen im Hefesystem. Der beobachtete Effekt zeigte sich zelllinien- und transfektionsmethodenunabhängig. Ein XAP2-vermittelter Abbau des GR als Ursache der Inhibition konnte ausgeschlossen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das TPR-Protein XAP2 den Glukokortikoidrezeptor auf mehreren Ebenen inhibiert – zum einen durch eine Beeinträchtigung der Hormonbindungsaffinität des Rezeptors, zum anderen durch eine Hemmung der Rezeptorakkumulation im Zellkern nach Ligandenbindung. Zudem konnte die Bedeutung charakteristischer Aminosäuren im Bereich der TPR-Domäne von XAP2 als unabdingbare Voraussetzung sowohl für die Interaktion mit hsp90 als auch für den inhibitorischen Effekt des Proteins auf den GR nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist XAP2 in die Reihe der GR-regulativen Cofaktoren aufzunehmen. Es weist hierbei einerseits eine hohe Strukturhomologie zu dem GR-Cofaktor und TPR-Protein FKBP52, andererseits funktionell eine starke Übereinstimmung mit FKBP51 auf. Mit Hinblick auf bereits bekannte Effekte von XAP2 auf den AhR kann daher geschlussfolgert werden, dass XAP2 im Gegensatz zu früheren Vermutungen verschiedene nukleäre Rezeptoren spezifisch reguliert. Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur genaueren Kenntnis von Funktion und Regulation des Glukokortikoidrezeptors und der HPA-Achse und kann zur weiteren Untersuchung von XAP2 in diesem Zusammenhang anregen.

Nicht zuletzt gründet dies auf der Hoffnung, dass eine genaue Kenntnis der Pathomechanismen von Erkrankungen, die mit einer Funktionsstörung der HPA-Achse einhergehen, wie etwa der Depression, zu einer Verbesserung der Behandlung der von diesen Erkrankungen betroffenen Patienten führt. Denkbare Ansätze könnten hierbei sowohl die Früherkennung eines Erkrankungsrisikos auf genetischer oder endokrinologischer Ebene, als auch Grundlagen zur Entwicklung neuer antidepressiv wirksamer Pharmaka bzw. eine bessere Prädiktionsfähigkeit hinsichtlich der Medikamentenresponse oder auch Psychotherapie-response einzelner Patientengruppen sein.

6. Literaturverzeichnis

- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*.181(96):223-30.
- Agashe, V.R., Hartl F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol*. 11(1):15-25.
- Almlöf, T., Wallberg, A.E., Gustafsson, J.A., Wright, A.P. (1998). Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry*. 37(26):9586-94.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W., Lee, K.F. (2000). Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*. 24(4):410-4.
- von Bardeleben, U., Holsboer, F. (1991). Effect of age on the cortisol response to human corticotropin-releasing hormone in depressed patients pretreated with dexamethasone. *Biol Psychiatry*. 29(10):1042-50.
- Bayatti, N., Behl, C. (2005). The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone. *Ageing Res Rev*. 4(2):258-70.
- Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G. (1989). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 83(6):851-7.
- Bell, D.R., Poland, A. (2000). Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J Biol Chem*. 275(46):36407-14.
- Berg, J.M. (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell*. 57(7):1065-8.
- Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Putz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M.A., Nickel, T., Kunzel, H.E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Baghai, T., Deiml, T., Zill, P., Bondy, B., Rupprecht, R., Messer, T., Kohnlein, O., Dabitz, H., Bruckl, T., Müller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J.C., Lohmussaar, E., Strom, T.M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., Müller-Myhsok, B. (2004). Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet*. 36(12):1319-25. Epub 2004 Nov 21.
- Birketvedt, G.S., Drivenes, E., Agledahl, I., Sundsfjord, J., Olstad, R., Florholmen, J.R. (2006). Bulimia nervosa--a primary defect in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Appetite*. 46(2):164-7.
- Brinkmann, A.O. (1994). Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. *J Pediatr Endocrinol*. 7(4):275-82.

- Bolger, G.B., Peden, A.H., Steele, M.R., MacKenzie, C., McEwan, D.G., Wallace, D.A., Huston, E., Baillie, G.S., Houslay, M.D. (2003). Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem.* 278(35):33351-63.
- Bose, S., Weikl, T., Bügl, H., Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science.* 274(5293):1715-7.
- Boyle, M.P., Brewer, J.A., Funatsu, M., Wozniak, D.F., Tsien, J.Z., Izumi, Y., Muglia, L.J. (2005). Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(2):473-8.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.* 24(4):136-41.
- Bumke, O. (1936). *Lehrbuch der Geisteskrankheiten.* München: Verlag von J.F. Bergmann.
- Butler, P.W., Besser, G.M. (1968). Pituitary-adrenal function in severe depressive illness. *Lancet.* 1(7554):1234-6.
- Calfa, G., Kademian, S., Ceschin, D., Vega, G., Rabinovich, G.A., Volosin, M. (2003). Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology.* 28(5):687-701.
- Carroll, B.J., Martin, F.I., Davies, B. (1968). Pituitary-adrenal function in depression. *Lancet.* 1(7556):1373-4.
- Carver, L.A., Bradfield, C.A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem.* 272(17):11452-6.
- Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E., Bradfield, C.A. (1998). Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem.* 273(50):33580-7.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol.* 23(3):255-75.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol.* 3(1):93-6.
- Coste, S.C., Kesterson, R.A., Heldwein, K.A., Stevens, S.L., Heard, A.D., Hollis, J.H., Murray, S.E., Hill, J.K., Pantely, G.A., Hohimer, A.R., Hatton, D.C., Phillips, T.J., Finn, D.A., Low, M.J., Rittenberg, M.B., Stenzel, P., Stenzel-Poore, M.P. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet.* 24(4):403-9.
- Dull, A.B., Carlson, D.B., Petrusis, J.R., Perdew, G.H. (2002). Characterization of the phosphorylation status of the hepatitis B virus X-associated protein 2. *Arch Biochem Biophys.* 406(2):209-21.

- Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79(2):425-49.
- Gibbons, J.L., McHugh, P.R., (1962). Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatr Res.* 1:162-71.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 46(5):645-52.
- Gold, S.M., Mohr, D.C., Huitinga, I., Flachenecker, P., Sternberg, E.M., Heesen, C. (2005). The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. *Trends Immunol.* 26(12): 644-52.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D., Toft, D.O. (1999). The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J Biol Chem.* 274(25):17525-33.
- Hendrick, J.P., Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62:349-84.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., Evans, R.M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 49(1):39-46.
- Hollenberg, S.M., Evans, R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 55: 899-906.
- Hollingshead, B.D., Petrusis, J.R., Perdew, G.H. (2004). The aryl hydrocarbon (Ah) receptor transcriptional regulator hepatitis B virus X-associated protein 2 antagonizes p23 binding to Ah receptor-Hsp90 complexes and is dispensable for receptor function. *J Biol Chem.* 279(44):45652-61.
- Holsboer, F., von Bardeleben, U., Wiedemann, K., Müller, O.A., Stalla, G.K. (1987). Serial assessment of corticotropin-releasing hormone response after dexamethasone in depression: Implications for pathophysiology of DST nonsuppression. *Biol Psychiatry.* 22: 228-34.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 23(5):477-501.
- Holsboer, F. (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *Journal of Affective Disorders.* 62: 77-91.
- Jacobson, L., Muglia, L.J., Weninger, S.C., Pacak, K., Majzoub, J.A. (2000). CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors. *Neuroendocrinology.* 71(2):79-87.
- Kashuba, E., Kashuba, V., Pokrovskaja, K., Klein, G., Szekely, L. (2000). Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds XAP-2, a protein associated with Hepatitis B virus X antigen. *Oncogene.* 19(14):1801-6.

- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2000). The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem.* 275(52):41317-24.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol.* 21(7):2594-607.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2002). Two distinct regions of the immunophilin-like protein XAP2 regulate dioxin receptor function and interaction with hsp90. *J Biol Chem.* 277(14):11795-801.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA.* 289(23):3095-105.
- Kishimoto, T., Radulovic, J., Radulovic, M., Lin, C.R., Schrick, C., Hooshmand, F., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., Spiess, J. (2000). Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet.* 24(4):415-9.
- de Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 6(6):463-75.
- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y.S., Inouye, C., Yang, W.M., Seto, E. (1996). XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res.* 24(23):4741-50.
- LaPres, J.J., Glover, E., Dunham, E.E., Bunker, M.K., Bradfield, C.A. (2000). ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* 275(9): 6153-9.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 275(5679):416-20.
- Lees, M.J., Whitelaw, M.L. (2002). Effect of ARA9 on dioxin receptor mediated transcription. *Toxicology.* 181-182:143-6.
- Lees, M.J., Peet, D.J., Whitelaw, M.L. (2003). Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem.* 278(38):35878-88.
- Ma, Q., Whitlock, J.P.Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah Receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem.* 272(14): 8878-84.
- Marks, A.R. (1996). Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev.* 1996 Jul;76(3):631-49.

- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol.* 18(2):978-88.
- Meyer, B.K., Perdew, G.H. (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry.* 38(28):8907-17.
- Meyer, B.K., Petrusis, J.R., Perdew, G.H. (2000). Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones.* 5(3):243-54.
- Modell, S., Yassouridis, A., Huber, J., Holsboer, F. (1997). Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology* 65(3):216-22.
- Möller, H.J., Laux, G., Deister, A. (2001). *Psychiatrie und Psychotherapie.* Stuttgart: Thieme.
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Silverstein, A.M., Dittmar, K.D., Estrada, L., Pratt, W.B. (2000). The Hsp organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system. *J Biol Chem.* 275(10):6894-900.
- Müller, M.B., Landgraf, R., Preil, J., Sillaber, I., Kresse, A.E., Keck, M.E., Zimmermann, S., Holsboer, F., Wurst, W. (2000). Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology.* 141(11):4262-9.
- Müller, M.B., Holsboer, F. (2006). Mice with mutations in the HPA-system as models for symptoms of depression. *Biol Psychiatry.* 59(12):1104-15.
- Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P., Majzoub, J.A. (1995). Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature.* 373(6513):427-32.
- Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science.* 226(4680):1342-4.
- Pepin, M.C., Govindan, M. V., Barden, N. (1992). Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. *Mol Pharmacol.* 41:1016-22.
- Petrulis, J.R., Hord, N.G., Perdew, G.H. (2000). Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *J Biol Chem.* 275(48):37448-53.
- Petrulis, J.R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., Perdew, G.H. (2003). The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem.* 278(4):2677-85.

- Pollenz, R.S., Dougherty, E.J. (2005). Redefining the role of the endogenous XAP2 and C-terminal hsp70-interacting protein on the endogenous Ah receptors expressed in mouse and rat cell lines. *J Biol Chem.* 280(39):33346-56.
- Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18(3):306-60.
- Preil, J., Muller, M.B., Gesing, A., Reul, J.M., Sillaber, I., van Gaalen, M.M., Landgrebe, J., Holsboer, F., Stenzel-Poore, M., Wurst, W. (2001). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. *Endocrinology.* 142(11):4946-55.
- Ramadoss, P., Petrusis, J.R., Hollingshead, B.D., Kusnadi, A., Perdew, G.H. (2004). Divergent roles of hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2) in human versus mouse Ah receptor complexes. *Biochemistry.* 43(3):700-9.
- Reul, J.M., Stec, I., Soder, M., Holsboer, F. (1993). Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology.* 133(1):312-20.
- Ridder, S., Chourbaji, S., Hellweg, R., Urani, A., Zacher, C., Schmid, W., Zink, M., Hortnagl, H., Flor, H., Henn, F.A., Schutz, G., Gass, P. (2005). Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci.* 25(26):6243-50.
- Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., Smith, D.F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J.* 22(5):1158-67.
- Rubin, R.T., Poland, R.E., Lesser, I.M., Winston, R.A., Blodgett, A.L. (1987). Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry.* 44:328-36.
- Rubin, R.T., Phillips, J.J., Sadow, T.F., McCracken, J.T. (1995). Adrenal gland volume in major depression. Increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 52(3):213-8.
- Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., Chinkers, M. (1999). Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J Biol Chem.* 274(29):20060-3.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell.* 101(2):199-210.
- Schmid, F.X. (1998). Catalysis of protein folding by prolyl isomerases. In: *Molecular chaperones in the life cycle of proteins.* Fink, A.L., Goto, Y. (Hrsg.). New York: Dekker.

- Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.). (1997). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Smith, G.W., Aubry, J.M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, L.M., Gold, L.H., Chen, R., Marchuk, Y., Hauser, C., Bentley, C.A., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W., Lee, K.F. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*. 20(6):1093-102.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*. 365: 170-5.
- Spuy, van der, J., Cheetham, M.E. (2004). Role of AIP and its homologue the blindness-associated protein AIPL1 in regulating client protein nuclear translocation. *Biochem Soc Trans*. 32(Pt 4):643-5.
- Sullivan, W.P., Owen, B.A., Toft, D.O. (2002). The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. *J Biol Chem*. 277(48):45942-8.
- Sumanasekera, W.K., Tien, E.S., Turpey, R., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (2003). Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J Biol Chem*. 278(7):4467-73.
- Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. 63:451-86.
- Wahli, W., Martinez, E. (1991). Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J*. 5(9):2243-9.
- Welch, W.J., Feramisco, J.R. (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem*. 257(24):14949-59.
- Weninger, S.C., Dunn, A.J., Muglia, L.J., Dikkes, P., Miczek, K.A., Swiergiel, A.H., Berridge, C.W., Majzoub, J.A. (1999). Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(14):8283-8.
- Wei, Q., Lu, X.Y., Liu, L., Schafer, G., Shieh, K.R., Burke, S., Robinson, T.E., Watson, S.J., Seasholtz, A.F., Akil, H. (2004). Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(32):11851-6.
- Wohnik, G.M., Rugg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem*. 280(6):4609-16.

- Yang, Z., Wolf, I.M., Chen, H., Periyasamy, S., Chen, Z., Yong, W., Shi, S., Zhao, W., Xu, J., Srivastava, A., Sanchez, E.R., Shou, W. (2006). FKBP52 is essential to uterine reproductive physiology controlled by the progesterone receptor A isoform. *Mol. Endocrinol.* 20(11):2682-94.
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10):781-91.
- Zhao, W., Zhong, L., Wu, J., Chen, L., Qing, K., Weigel-Kelley, K., Larsen, S.H., Shou, W., Warrington Jr., K.H., Srivastava, A. (2006). Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2. *Virology.* 353(2):283-93.
- Zobel, A.W., Yassouridis, A., Frieboes, R.M., Holsboer, F. (1999). Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am J Psychiatry.* 156(6):949-51.

7. Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
AIP	AhR-interagierendes Protein
ARA 9	AhR-assoziiertes Protein 9
ATP	Adenosin 5' - Triphosphat
β-Gal	β- Galaktosidase
CR	Cortikosteroidrezeptor
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DCR	distale C-terminale Region
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DSM	Diagnostisches und statistisches Manual
DST	Dexamethason-Hemmtest
EBNA3	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 3
FKBP	engl.: FK505 Binding Protein
GR	Glukokortikoidrezeptor
Hsp	hsp-organisierendes Protein
HPA	engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal axis
Hsp	engl.: heat shock protein
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MMTV	engl.: mouse mammary tumor virus
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MUT	Mutante
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE4	Phosphodiesterase 4
PPAR α	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α
PP5	Serin/Threonin Protein Phosphatase 5
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PVN	Nucleus paraventricularis
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	engl. : sodium dodecyl sulfate
TPR	Tetratricopeptidrepeat
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
XAP2	Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
0 µg FKBP51	-	0,00018683	0,00026348	9,8855E-05
	-	0,00025096	0,00019967	0,00010855
	+	0,02578496	0,03104563	0,03167188
	+	0,03130641	0,01382822	0,03888914
0,1 µg FKBP51	-	0,00018569	0,00013093	0,00010948
	-	0,00027734	0,00011142	9,5904E-05
	+	0,02194893	0,00817452	0,02149607
	+	0,01877626	0,00991994	0,01821502
0,15 µg FKBP51	-	0,00026351	0,00020624	6,7155E-05
	-	0,00020584	0,0001117	8,8865E-05
	+	0,01914211	0,01132014	0,01699869
	+	0,02131267	0,0087864	0,01256451
0,2 µg FKBP51	-	0,00025415	0,00015201	0,00013221
	-	0,00016872	0,00010364	6,7847E-05
	+	0,01791178	0,00496045	0,00961629
	+	0,02096546	0,00557104	0,01025409
0,3 µg FKBP51	-	0,00011787	0,00015072	0,00013318
	-	0,00014387	9,6353E-05	6,9476E-05
	+	0,01227876	0,00439894	0,00613416
	+	0,01250289	0,00505675	0,0049396

Rohwerte der Transfektionen von FKBP51 in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
0 µg FKBP52	-	0,00073786	0,00018683	0,00026348	9,8855E-05
	-	0,000665	0,00025096	0,00019967	0,00010855
	+	0,0277781	0,02578496	0,03104563	0,03167188
	+	0,02990389	0,03130641	0,01382822	0,03888914
0,1 µg FKBP52	-	0,00056271	0,000232	0,0001053	0,00012129
	-	0,00052292	0,00034369	0,00011222	0,0001214
	+	0,01629315	0,07919057	0,02226905	0,05356462
	+	0,01302671	0,06544104	0,02126263	0,05383839
0,15 µg FKBP52	-	0,0003948	0,00071859	0,00024042	0,00034514
	-	0,00046994	0,00038229	0,00012192	0,00012524
	+	0,02016853	0,08380171	0,02129108	0,0482699
	+	0,02072239	0,07666214	0,02025176	0,05564022
0,2 µg FKBP52	-	0,00050013	0,00066357	0,00022073	0,00033953
	-	0,00054106	0,00024808	0,00013448	0,00010615
	+	0,01847998	0,09888853	0,01933945	0,04196582
	+	0,01432056	0,08636847	0,01180847	0,04069527
0,3 µg FKBP52	-	0,00038539	0,00019373	0,00012541	8,4759E-05
	-	0,00040801	0,00029542	0,00013259	0,00012023
	+	0,0132116	0,06161747	0,01916384	0,04786872
	+	0,00878273	0,056823	0,02169062	0,04172681

Rohwerte der Transfektionen von FKBP52 in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7
0 µg XAP2	-	0,00059682	0,00053096	0,00042435	0,00018683	0,00012996	0,00019662	0,00026244
	-	0,00064001	0,0006086	0,00043657	0,00025096	0,00012857	0,00020371	0,00028519
	+	0,02585194	0,01776768	0,05477444	0,02578496	0,0137351	0,04115428	0,03860323
	+	0,02628382	0,01802697	0,0768366	0,03130641	0,01254111	0,0254391	0,04173529
0,1 µg XAP2	-	0,00068852	0,00066159	0,00069754	0,00030142	0,00040983	0,00026904	0,00029274
	-	0,00055003	0,00064147	0,00043111	0,00018829	0,00011529	0,00014582	0,00033332
	+	0,0117006	0,0092995	0,04896896	0,01788334	0,00948212	0,01850627	0,03280658
	+	0,00934831	0,01083995	0,05699347	0,01818575	0,00882332	0,0167496	0,02931466
0,15 µg XAP2	-	0,00088077	0,00056965	0,00074688	0,00029829	0,00042845	0,00021173	0,00040741
	-	0,00076379	0,0005557	0,00042543	0,00020189	0,00012924	0,00012393	0,00040243
	+	0,00755979	0,00958348	0,03230933	0,01605245	0,00797575	0,01638283	0,02242189
	+	0,00755354	0,00927235	0,03869702	0,01888334	0,00936358	0,01456016	0,02303335
0,2 µg XAP2	-	0,00094689	0,00086582	0,00040781	0,00014606	0,00018064	0,00014993	0,00036918
	-	0,0012579	0,00061876	0,00044791	0,00022573	0,00016152	0,00016831	0,00027559
	+	0,01485059	0,00655812	0,02831065	0,01161236	0,00692239	0,01738813	0,0191587
	+	0,00983728	0,00355688	0,03107695	0,01449317	0,00818625	0,01538164	0,02099104
0,3 µg XAP2	-	0,00158737	0,00053867		0,0002813	0,00017768	0,00025191	0,000253
	-	0,00188976	0,00048614		0,00020016	0,00013245	0,00016577	0,0002876
	+	0,00725282	0,00388426		0,01043162	0,00673885	0,01084013	0,01624778
	+	0,00454003	0,00415593		0,01061471	0,00633036	0,01113345	0,01288001
0,4 µg XAP2	-	0,00192317	0,00053446		0,00028275	0,00021085	0,00019502	0,00031941
	-	0,00125872	0,00045421		0,00023129	0,00019345	0,00016921	0,00029764
	+	0,00642539	0,00299879		0,00779736	0,00540395	0,00794296	0,01086592
	+	0,00598661	0,00251579		0,00638052	0,00587986	0,00899417	0,01092515

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

Flag-GR	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
0 µg XAP2	-	0,00040536	9,5504E-05	0,00026663
	-	0,00031109	0,00010552	0,00036403
	+	0,00894598	0,0094098	0,03681671
	+	0,01148438	0,01120228	0,03910635
0,1 µg XAP2	-	0,00036221	0,00019537	0,00055593
	-	0,00037158	0,00011497	0,00032644
	+	0,00880869	0,00876834	0,02553743
	+	0,0079543	0,0073399	0,02431714
0,15 µg XAP2	-	0,00046463	0,00023401	0,00055842
	-	0,00043215	0,00016193	0,00039027
	+	0,0045175	0,00706593	0,01739176
	+	0,00500772	0,00777952	0,02403325
0,2 µg XAP2	-	0,00064074	0,0002237	0,00019699
	-	0,00066286	0,00022588	0,00022411
	+	0,00784927	0,00924229	0,01697505
	+	0,0082278	0,00840619	0,01400911
0,3 µg XAP2	-	0,00079966	0,00030924	0,00035672
	-	0,00096207	0,00025254	0,00030959
	+	0,00741617	0,00561688	0,01200467
	+	0,00777418	0,00441121	0,01200467
0,4 µg XAP2	-	0,00084636	0,00035647	0,00040471
	-	0,00082401	0,00031093	0,00034581
	+	0,00729682	0,00564513	0,01498653
	+	0,00619635	0,00546728	0,01890437

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 und FLAG-GR in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

0,0125 µg GR	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5
0 µg XAP2	-	0,00024805	0,0004115	0,0002104	0,00041989	0,00051857
	-	0,00028012	0,0004278	0,00023432	0,00040796	0,00037726
	+	0,01257816	0,01342911	0,00081884	0,01201847	0,01447982
	+	0,01429255	0,01514073	0,00084423	0,01300245	0,01753641
0,1 µg XAP2	-	0,00028454	0,00028622	0,00020807		
	-	0,00018145	0,00035299	0,00016388		
	+	0,00502406	0,00763444	0,00043333		
	+	0,00517294	0,01030539	0,00046944		
0,15 µg XAP2	-	0,00017776	0,00032561	0,00018783		
	-	0,00014944	0,00029991	0,00015872		
	+	0,00527335	0,00667261	0,00036742		
	+	0,00400971	0,00711107	0,00030902		
0,2 µg XAP2	-	0,0001573	0,00028408	0,00018085		
	-	0,00015436	0,00024204	0,00013341		
	+	0,00429257	0,00677073	0,0002472		
	+	0,00479564	0,00724719	0,00027197		
0,3 µg XAP2	-	0,00020794	0,0003598	0,00013022		
	-	0,00016894	0,0002894	0,00013103		
	+	0,00341239	0,00644655	0,0002123		
	+	0,00294431	0,00526807	0,0002558		
0,4 µg XAP2	-	0,00020793	0,00028466	0,00019008		
	-	0,00016892	0,000317	0,00016031		
	+	0,00229955	0,00409924	0,00022823		
	+	0,00223233	0,00378267	0,00023019		

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 und 0,0125 µg GR in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

0,025 µg GR	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5
0 µg XAP2	-	0,00019662	0,00026244	0,00025856	0,00053728	0,00054337
	-	0,00020371	0,00028519	0,00024806	0,00035562	0,00031247
	+	0,04115428	0,03860323	0,00494654	0,03488808	0,04374945
	+	0,0254391	0,04173529	0,00358306	0,0416895	0,05043134
0,1 µg XAP2	-	0,00026904	0,00029274	0,00014746		
	-	0,00014582	0,00033332	0,00015217		
	+	0,01850627	0,03280658	0,00222487		
	+	0,0167496	0,02931466	0,00200869		
0,15 µg XAP2	-	0,00021173	0,00040741	0,00012995		
	-	0,00012393	0,00040243	0,0001006		
	+	0,01638283	0,02242189	0,00079892		
	+	0,01456016	0,02303335	0,00100711		
0,2 µg XAP2	-	0,00014993	0,00036918	0,00013882		
	-	0,00016831	0,00027559	0,00013391		
	+	0,01738813	0,0191587	0,00123894		
	+	0,01538164	0,02099104	0,00146534		
0,3 µg XAP2	-	0,00025191	0,000253	0,00015223		
	-	0,00016577	0,0002876	0,00013826		
	+	0,01084013	0,01624778	0,00094062		
	+	0,01113345	0,01288001	0,0010551		
0,4 µg XAP2	-	0,00019502	0,00031941	0,00019663		
	-	0,00016921	0,00029764	0,00016063		
	+	0,00794296	0,01086592	0,00082948		
	+	0,00899417	0,01092515	0,00065813		

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 und 0,025 µg GR in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7	Experiment 8	Experiment 9
0 µg XAP2	-	1549,26254	221,163166	235,249042	113,361169	184,357542	992,876712	226,215278	1028,01047	294,533762
	+	50050,2703	6888,21082	40583,3992	8043,30357	32106,469	86131,405	39035,743	149014,094	239964,651
2 µg XAP2	-	1331,7139	236,434109	559,353349	113,129103	321,653543	758,638743	503,539823	3880,34993	279,207921
	+	15748,5477	1500,25974	39430,7216	4959,47242	22855	50804,4053	66345,5621	109392,5	64658,8378
4 µg XAP2	-	652,926209	252,427184	350,236967	112,837838	237,218045	1094,80519	519,704433	2351,1236	370,833333
	+	6171,73252	1348,87006	28059,2068	4776,90763	10984,6473	58927,619	16280,1843	85679,1165	145516,571
6 µg XAP2	-	676,911315	210,979228	423,273657	107,293666	190,625	856,387665	332,984293	1174,25926	368,766404
	+	10428,3673	1269,84127	10785,0895	6652,66055	8089,20863	54240,0943	18624,4898	61967,2854	196219,558
8 µg XAP2	-	757,836338	203,206997	290,136571	140,09434		1065,5814	355,980861	1425,4902	447,536232
	+	14748,8243	1029,32099	36395,7692	3935,24752		51604,6154		54737,8109	130272,055
10 µg XAP2	-	932,398317	256,556291	295,379538						
	+	19147,3304	767,810026	37127,7469	111,764706	212,21374	1360,3352		1149,54296	298,554217
					2221,86312	4348,4375	58481,7143		52350,2315	85510,9244

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 in HEK-Zellen mittels Elektroporation. Dargestellt sind die β -Galaktosidase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7	Experiment 8
0 µg XAP2	-	388,439306	323,214286	514,655172	709,195402	769,620253	484,42623	690,68323	474,452555
	-	194,463668	299,212598	628,735632	581,865285	546,428571	311,320755	558,422939	418,072289
	+	69721,4592	25774,4541	14297,3214	24837,4449	24232,9193	31224,8408	114513,081	58546,2687
	+	68692,4303	20734,466	16253,0973	26027,0386	26027,0115	36958,3851	124856,25	54250
2 µg XAP2	-	282,53012	656,25	417,931034	753,378378	633,333333	439,455782	736,860068	544,221106
	-	178,056426	565,217391	538,52459	745,833333	628,301887	370,289855	335,492228	559,398496
	+	26295,625	5768,62745	9717,6	10962,1849	13085,2941	16416,0976	50865,977	40348,6188
	+	30066,0661	3840	11595,3846	11719,3548	14036,1809	21756	61962,6703	19804,1353
4 µg XAP2	-	274,193548	384,90566	520,472441	571,649485	420,238095	442,708333	918,367347	609,42029
	-	200,769231	420	576,851852	455,982906	469,270833	336,363636	346,987952	434,394904
	+	9862,5	815,873016	6388,99083	8188,99083	15794,3128	8049,03846	15200,3953	11389,2193
	+	11902,1201	662,5	11795,1456	9608	9800	7942,85714	14511,157	25336,5385
6 µg XAP2	-	268,205128		480,991736	675,438596	525,465839	511,538462	434,862385	415,044248
	-	262,211982		459,230769	535,820896	359,276018	428,205128	602,690583	514,942529
	+	7387,11656		5686,17886	2654,41176	16484,898	5044,68085	11994,6844	966,477273
	+	7839,62264		4921,3198	3223,07692	12302,551	3247,32143	9681,74157	1645,71429
8 µg XAP2	-	330,994152	579,545455	420,134228	738	562,295082	200,431034	532,432432	346,889952
	-	319,078947	447,368421	412,666667	745,652174	447,368421	246,938776	525,104603	296,38009
	+	4218,43575	2242,85714	2132,40741	1329,89691	857,85124	3723,25581	11594,0984	9458,42294
	+	5269,48052	1528,33333	2292,36111	1122,54902	902,255639	4470,25862	13071,4286	7775,38941
10 µg XAP2	-	277,272727	202,39521	1158,53659	392,592593	431,707317	209,89011	528,327645	409,268293
	-	266,169154	167,021277	1234,21053	350,46729	439,903846	208,61244	421,311475	417,277487
	+	3019,29825	2098,36066	2492,85714	2336,53846	1078,01047	3975,81522	8557,57576	2347,13115
	+	2945,85153	1820,93023	2617,3913	3106,71296	958,940397	5949,11243	8015,6051	1580,61538

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 in SK-Zellen mittels Elektroporation. Dargestellt sind die β -Galaktosidase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
0 µg XAP2	-	0,00016545	0,000198	0,00019938
	-	0,00018205	0,00020571	0,00018948
	0,1 nM	0,00016836	0,00020656	0,00019884
	0,1 nM	0,00017714	0,00024101	0,0002248
	1 nM	0,00055168	0,00102426	0,00328797
	1 nM	0,0005985	0,00107708	0,00201803
	10 nM	0,01347783	0,02276415	0,01919869
	10 nM	0,02124633	0,01951302	0,01941068
	100 nM	0,03651997	0,05985096	0,03475121
	100 nM	0,04729562	0,06468778	0,04022113
	1000 nM	0,05678162	0,07189672	0,03971831
	1000nM	0,06199015	0,06609033	0,05196397
0,2 µg XAP2	-	0,00015368	0,00016338	0,00020114
	-	0,00015924	0,00012944	0,00022687
	0,1 nM	0,00016396	0,00015202	0,00024934
	0,1 nM	0,00012984	0,00016436	0,00024957
	1 nM	0,00016511	0,00021795	0,0006298
	1 nM	0,00016545	0,00020408	0,00059362
	10 nM	0,00582355	0,00580147	0,01051197
	10 nM	0,00529095	0,00716303	0,00791509
	100 nM	0,02668016	0,03268405	0,03351819
	100 nM	0,03090057	0,03150483	0,03194564
	1000 nM	0,04033758	0,04307657	0,0407946
	1000 nM	0,04302494	0,05092093	0,04507619

Rohwerte der Transfektionen von XAP2 in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5	Experiment 6	Experiment 7
0 µg	-	0,00027016	0,00034122	0,00011957	0,00015625	0,00042435	0,00051773	0,00019671
XAP2TPRmut	-	0,00024905	0,0002634	0,00015178	0,00022458	0,00043657	0,00053121	0,00018891
	+	0,01342722	0,02586469	0,02044722	0,01264919	0,05477444	0,02900451	0,01812904
	+	0,01327023	0,02206086	0,02460224	0,01378783	0,0768366	0,02047583	0,01323672
0,1 µg	-	0,00023371	0,00029717	0,00016329	0,0001946	0,0003944	0,00062392	0,0002039
XAP2TPRmut	-	0,00019352	0,00019412	0,0001119	0,00018184	0,00038973	0,00038742	0,00014972
	+	0,01117921	0,02498573	0,01565476	0,00937475	0,06043024	0,02597189	0,00907548
	+	0,01261624	0,02911802	0,01419777	0,01000269	0,05316973	0,02486378	0,0097928
0,15 µg	-	0,00026519	0,00035118	0,00019084	0,00015255	0,00061352	0,00035827	0,00020425
XAP2TPRmut	-	0,00023642	0,00024547	0,00013992	0,0001343	0,00039878	0,00039047	0,00020739
	+	0,01097745	0,02708957	0,01351134	0,00645081	0,06766926	0,02351992	0,01159538
	+	0,01277065	0,02316597	0,01173431	0,00811584	0,06925824	0,02402779	0,00942959
0,2 µg	-	0,00023151	0,00023272	0,000183	0,00017074	0,00075858	0,00039092	0,00020621
XAP2TPRmut	-	0,00017606	0,00025215	0,00010011	0,00012583	0,00046134	0,00031204	0,00016092
	+	0,00987221	0,01891832	0,01354778	0,00692537	0,055207	0,02278446	0,00016092
	+	0,01001588	0,01764375	0,01437517	0,00749084	0,07366968	0,02239456	0,01103427
0,3 µg	-	0,00028423	0,00031722	0,00019432	0,00015182	0,000351	0,00036292	0,00993041
XAP2TPRmut	-	0,00024949	0,00022803	0,00014963	0,00012566	0,00043568	0,00029704	0,00032738
	+	0,01601558	0,01571773	0,00896504	0,0082305	0,05247615	0,02259797	0,00018732
	+	0,01693765	0,0166319	0,0108708	0,00764363	0,04571628	0,02535897	0,00777371
0,4 µg	-	0,00037725	0,00042241	0,00029067	0,00017405	0,00067849		0,00810846
XAP2TPRmut	-	0,00026157	0,00029992	0,00020046	0,00015918	0,00056672		0,0002101
	+	0,01391174	0,01491036	0,00990253	0,0060861	0,03813846		0,0001996
	+	0,01296359	0,01265367	0,00871371	0,00521158	0,04215178		0,00478318
								0,00658152

Rohwerte der Transfektionen von XAP2TPRmut in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

	Hormon	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
0 µg FKBP51TPRmut	-	0,00011957	0,00015625	0,00042435
	-	0,00015178	0,00022458	0,00043657
	+	0,02044722	0,01264919	0,05477444
	+	0,02460224	0,01378783	0,0768366
0,1 µg FKBP51TPRmut	-	0,00025135	0,00017783	0,00030149
	-	8,5443E-05	0,00019123	0,00025516
	+	0,03348933	0,02050272	0,065097
	+	0,03339292	0,02305965	0,07550775
0,15 µg FKBP51TPRmut	-	0,00024764	0,00028094	0,00073658
	-	0,00011535	0,00019722	0,00042402
	+	0,02959573	0,02134481	0,08456588
	+	0,02720326	0,02130771	0,10087386
0,2 µg FKBP51TPRmut	-	0,0001076	0,00017966	0,00090202
	-	9,2741E-05	0,00014241	0,00037699
	+	0,02691388	0,01426058	0,08767418
	+	0,02393669	0,01367076	0,09211818
0,3 µg FKBP51TPRmut	-	0,00022728	0,0001669	0,0001172
	-	0,00010261	0,00013494	0,00026897
	+	0,01719888	0,01221531	0,06233849
	+	0,01544114	0,0114716	0,05185385
0,4 µg FKBP51TPRmut	-	0,00016497	0,00016856	0,00061974
	-	0,00010035	0,00013943	0,00030103
	+	0,01083383	0,00725117	0,03742901
	+	0,01012409	0,00852517	0,04999569

Rohwerte der Transfektionen von FKBP51TPRmut in SK-Zellen mittels kationischem polymerischem Transfektionsreagenz. Dargestellt sind die Gaussia-Luciferase berichtigten Firefly-Luciferase-Messwerte ohne/mit Hormoninkubation.

Menge: 1	.00				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	11914.23	6	1985.71		
Treat	1098.79	1	1098.79	.55	.485
Menge: 2	.10				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	11611.66	6	1935.28		
Treat	1720.98	1	1720.98	.89	.382
Menge: 3	.15				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	7476.60	6	1246.10		
Treat	2131.70	1	2131.70	1.71	.239
Menge: 4	.20				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	5430.30	6	905.05		
Treat	1233.95	1	1233.95	1.36	.287
Menge: 5	.30				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	3557.82	6	592.97		
Treat	3673.56	1	3673.56	6.20	.047
Menge: 6	.40				
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+Residual	1305.10	6	217.52		
Treat	923.66	1	923.66	4.25	0.85

Ergebnisse der Multivariaten Varianzanalyse

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Anna Maria Länger
Geburtsdatum	02.04.1979
Geburtsort	München
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
Eltern:	Elisabeth Sedlmayr-Länger, Dipl.-Psych., Dr. phil., Dr. phil. habil., Priv.-Doz.; Horst Länger, Dipl.-Soz.

Ausbildung

1985 – 1989	Besuch der Grundschule Ismaning
1989 – 1998	Besuch des Städt. Luisengymnasiums München
1998 – 2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München Mai 2005: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000 – 2002	Studium der Psychologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2005 – 2006	Promotionsstudium im Fach Humanmedizin an der Ludwigs- Maximilians-Universität München
seit September 2006	Assistenzärztin an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwigs-Maximilians-Universität München