

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

**Etablierung eines zellulären genetischen Screeningverfahrens zur
Suche nach Regulatoren des Glucocorticoidrezeptors und
Identifizierung von Cofilin 1 als Glucocorticoidrezeptor-Inhibitor**

Joëlle Béatrice Rüegg

aus

Zürich

2004

Erklärung:

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

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 2.12.2004

Joëlle Rüegg

Dissertation eingereicht am 23.9.2004

1.Gutachter: Prof. F. Holsboer

2.Gutachter: PD Dr. H. Zorbas

Mündliche Prüfung am: 1.12.2004

Für meine Familie

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie durchgeführt und teilweise von der Studienstiftung des deutschen Volks finanziert. Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Rüegg J, Holsboer F, Turck C, Rein T: Cofilin 1 Is Revealed as Inhibitor of Glucocorticoid Receptor by Analysis of Hormone-Resistant Cells. *Molecular and Cellular Biology*, in press.

Abel GA, Wochnik GM, **Rüegg J**, Rouyer A, Holsboer F, Rein T: Activity of the GR in G2 and mitosis. *Molecular Endocrinol.* 2002 Jun;16(6):1352-66.

Ich möchte mich sehr herzlich bei **Prof. Florian Holsboer** bedanken, der es mir ermöglicht hat, in einem anregenden wissenschaftlichen Umfeld meine Doktorarbeit durchzuführen.

Dr. Haralabos Zorbas danke ich herzlich dafür, dass er meine Doktorarbeit an der LMU vertreten hat.

Ich bedanke mich bei der **Studienstiftung des deutschen Volks** für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit, bei der Sommerakademie in Molveno meinen Freundeskreis um einige liebe Menschen zu erweitern.

Dr. Theo Rein danke ich für die bestmögliche Betreuung, Unterstützung und Förderung, die man sich während der Doktorarbeit wünschen kann.

Bei **Dr. Chris Turck, Isabelle Birg** und **Dale Milfay** möchte ich mich für ihre Hilfe bei den 2D-Gelen und der Massenspektrometrie bedanken. **Dr. Dietmar Spengler** und **Dr. Christian Behl** danke ich für die Bereitstellung verschiedener Plasmide und Zelllinien.

Gabi, Amalia, Bärbel und allen anderen gegenwärtigen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern danke ich für das äusserst angenehme Arbeitsklima. **Bärbel** und **Paul** danke ich ausserdem für die Hilfe bei diversen Experimenten.

Marilyn, Sharon, Paul, Konny und **Wolle** danke ich für wissenschaftliche und weniger wissenschaftliche Gespräche bei und nach der Arbeit.

Ganz herzlich danke ich **René, Ina, Volker** und **Wolfgang**, die mich immer wieder erfolgreich daran erinnern haben, dass das Leben nicht nur aus Wissenschaft besteht.

Und bei allen Leuten aus Zürich, ganz besonders bei **Wiebke, Andreas, Valérie, Jonas, Barbara** und **Tina** bedanke ich mich, dass sie auch während meiner langen Abwesenheit immer an meinem Leben teilgenommen haben.

1. Einleitung	1
1.1 Glucocorticoide regulieren eine Vielzahl vitaler Funktionen	1
1.1.1 Aufgaben von Glucocorticoiden im Stoffwechsel, Immunsystem und zentralen Nervensystem	1
1.1.2 Glucocorticoide spielen eine fundamentale Rolle bei Stress	2
1.2 Die Funktionen der Glucocorticoide werden durch die Corticosteroidrezeptoren vermittelt	4
1.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Corticosteroidrezeptoren	4
1.2.2 Der Signalweg von GR und MR auf molekularer Ebene	6
1.2.3 GC-Resistenz	10
1.3 Hormonresistente Zellen als Hilfsmittel zur Entschlüsselung eines Rezeptorsignalwegs	11
1.3.1 Auf der Suche nach Faktoren, die den GR-Signalweg beeinflussen	11
1.3.2 Das Konzept dieser Arbeit	13
2. Material	15
2.1 Chemikalien und Lösungen	15
2.2 Enzyme	17
2.3 Antikörper	18
2.4 Bakterienstämme und Zelllinien	18
2.5 Plasmide	19
2.6 Oligonucleotide	21
2.7 Verbrauchsmaterial	26
2.8 Geräte	26
2.9 Kits und gebrauchsfertiges Material	28
3. Methoden	29
3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	29
3.2 Protokolle für Standardmethoden	30
3.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie	30
3.2.1.1 Bakterienkultur	30

3.2.1.2	Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren _____	31
3.2.1.3	Bearbeitung von DNA _____	33
3.2.1.4	Bearbeitung von RNA _____	36
3.2.2	Standardmethoden der Zellbiologie _____	38
3.2.2.1	Zellkultur _____	38
3.2.2.2	MTT-Assays _____	40
3.2.2.3	Transfektionen _____	40
3.2.2.4	Reportergen-Assays _____	41
3.2.2.5	Fluoreszenzanalyse _____	43
3.2.3	Standardmethoden der Proteinbiochemie _____	44
3.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration _____	44
3.2.3.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (Polyacrylamid- Gelelektrophorese) _____	45
3.2.3.3	2D-Gelelektrophorese _____	46
3.2.3.4	Coomassie-Färbung _____	48
3.2.3.5	Westernblot-Analyse _____	48
3.2.3.6	Protein-Protein-Co-Immunpräzipitierung _____	50
3.2.3.7	GST-pull-down-Assays _____	50
3.3	Details zum Vorgehen in der vorliegenden Arbeit _____	51
3.3.1	Klonierungen _____	51
3.3.2	Herstellung von Zelllinien _____	52
3.3.2.1	Stabile Transfektionen _____	52
3.3.2.2	Herstellung der Hormon-resistenten Zellen _____	54
3.3.2.3	Zellfusionen _____	54
3.3.3	Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien _____	55
3.3.3.1	RT-PCR _____	55
3.3.3.2	MTT-Assays _____	55
3.3.3.3	GFP-Messung mittels FACS und Westernblots _____	55
3.3.3.4	Reportergenassays _____	56
3.3.4	2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie _____	56
3.3.5	Methoden zur Untersuchung von Kandidaten-Proteinen _____	57
3.3.5.1	Northernblot-Analyse _____	57
3.3.5.2	Co-Immunpräzipitierung und GST-pull-down _____	57
3.3.5.3	Phalloidin-färbung des Actin-Cytoskeletts und Fluoreszenzanalyse _____	57

4. Resultate	59
4.1 Herstellung Hormon-resistenter Zelllinien	59
4.1.1 Vorüberlegungen	59
4.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Ausgangszelllinie	62
4.1.3 Mutagenese und Selektion von parental1	66
4.2 Detaillierte Analyse von mut1	69
4.2.1 Die Hormonresistenz in mut1 ist unabhängig vom chromosomalen Kontext	69
4.2.2 Eine dominante Mutation führt zur reduzierten Hormonantwort in mut1 Zellen	70
4.2.3 Proteomische Analyse der mut1-Zelllinie ergibt Thioredoxin, Hsp27, Reticulocalbin und Cofilin 1 als Kandidatengene	71
4.3 Untersuchung der Kandidaten-Proteine auf ihre Rolle in der GR-Signaltransduktion	74
4.3.1 Thioredoxin ist nicht für die Hormonresistenz der mut1 Zellen verantwortlich	74
4.3.2 Hsp27 und Reticulocalbin zeigen keinen Einfluss auf die GR-Signaltransduktion	75
4.3.3 Cofilin 1 inhibiert die GR-Funktion ohne an den Rezeptor zu binden	77
4.4 Aufklärung des Wirkungsmechanismus' von Cofilin	81
4.4.1 Die dephosphorylierte Form von Cofilin ist verantwortlich für dessen inhibitorischen Effekt	81
4.4.2 Cofilin erhöht die GR-Fraktion im Kern	84
4.4.3 Sowohl die Zerstörung der Actin-Filamente als auch die Erhöhung von G-Actin inhibiert die GR-Funktion	86
4.4.4 Erhöhung von freiem Actin induziert die Expression von c-Jun, einem GR-Inhibitor	89
5. Diskussion	90
5.1 Die Anwendung eines funktionellen Screens zur Suche von Regulatoren der GR-Funktion	90
5.2 Cofilin 1 ist ein neuer Inhibitor der GR-Funktion	93
6. Zusammenfassung	99

7. Literaturverzeichnis	101
8. Abkürzungen	109

1. Einleitung

1.1 Glucocorticoide regulieren eine Vielzahl vitaler Funktionen

1.1.1 Aufgaben von Glucocorticoiden im Stoffwechsel, Immunsystem und zentralen Nervensystem

Glucocorticoide (GCs) gehören zur Klasse der Steroidhormone und sind an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt. Bereits im Fötus sind sie verantwortlich für die intrauterinäre metabolische Homöostase sowie für die Reifung wichtiger Organsysteme wie der Lunge, des Verdauungstrakts, der Leber und des zentralen Nervensystems (ZNS) (Ng, 2000). Im adulten Organismus halten sie zusammen mit ihrem Gegenspieler Insulin den Glucose-Spiegel im Blut stabil oder erhöhen ihn bei akutem Zuckerbedarf. Dies bewirken sie, indem sie die Gluconeogenese in der Leber, den Eiweissabbau in Muskeln und lymphatischem Gewebe sowie die Fettverbrennung im Fettgewebe stimulieren, sowie die Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe reduzieren (Klinke and Silbernagl, 1994). Pharmakologisch werden sie vor allem als entzündungshemmende und immunsupprimierende Substanzen eingesetzt. Sie bewirken, dass weniger Leukozyten den Entzündungsherd infiltrieren und sich dort die Blutgefäße weniger stark erweitern, ausserdem inhibieren sie die Proliferation von Lymphozyten und die Aktivität von Makrophagen (Klinke and Silbernagl, 1994), indem sie Apoptose auslösen (Amsterdam and Sasson, 2002). GCs können aber auch anti-apoptotisch wirken, z.B. in den Zellen rund um einen Entzündungsherd, in Zellen der Milchdrüse, den Eierstöcken, in Leberzellen und Fibroblasten (Amsterdam and Sasson, 2002). Im ZNS erhöhen sie die Wahrnehmung von akustischen, taktilen, olfaktorischen und gustativen Reizen und beeinflussen die Gedächtnisfunktion (Klinke and Silbernagl, 1994).

GCs sind nicht nur an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt, sie können sogar im selben Prozess je nach Bedarf des Organismus' gegensätzliche Funktionen übernehmen. Ein Beispiel ist die oben kurz erwähnte Möglichkeit, apoptotisch aber auch anti-apoptotisch zu wirken. Ein anderes, das hier etwas detaillierter beschrieben werden soll, ist ihre Rolle in der Gedächtnisfunktion, die sie je nach Kontext aktivieren oder inhibieren können (Rooszendaal, 2002). Werden GCs kurz nach einem zu erinnernden Ereignis ausgeschüttet oder verabreicht, verbessern sie

die Gedächtnis-Ausbildung (Konsolidierung) (Kovacs and Sawchenko, 1996; Roozendaal, 2000). In diversen Studien an Menschen und Tieren wurde hingegen gefunden, dass chronische Behandlung mit GCs zu einer schlechteren Gedächtnisfunktion führt (Belanoff et al., 2001). Dies ist nicht auf eine verschlechterte Konsolidierung, sondern auf eine gestörte Wiedergabe der Erinnerungen zurückzuführen (de Quervain et al., 1998). Die gegensätzlichen Wirkungen auf Gedächtnisausbildung bzw. –wiedergabe können mit der Tatsache erklärt werden, dass die GC-Spiegel unter Stress ansteigen. Für die Entwicklung eines Menschen oder eines Tieres ist es wichtig, stressvolle Situationen zu erinnern. Durch die Ausschüttung von GCs verbessert sich die Konsolidierung dieser Ereignisse. Die Wiedergabe früherer Erinnerungen unter Stress interferiert hingegen mit der Konsolidierung und sollte daher unterdrückt werden. Die negative Wirkung von GCs auf die Gedächtnisfunktion kann also in Stresssituationen durchaus einer wichtigen adaptiven Funktion dienen (Roozendaal, 2002).

1.1.2 Glucocorticoide spielen eine fundamentale Rolle bei Stress

GCs üben ihre Funktionen sowohl unter Basalbedingungen als auch bei akuten Anforderungen an den Organismus z.B. bei körperlicher Arbeit und insbesondere bei Stress aus. Als Stress wird die Reaktion eines Organismus' auf potentiell schädigende Einflüsse (Stressoren) bezeichnet. Stressoren können physischer Natur sein, schliessen aber auch psychologische Belastungen mit ein. Heutzutage ist anerkannt, dass letztere mit zu den stärksten Stressauslösern gehören (Heuser and Lammers, 2003). Die Stressantwort wird durch das Zusammenspiel von Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde vermittelt, die zusammen hypothalamo-hypophysäre-adrenocorticale- (engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal) oder HPA-Achse genannt werden (**Abb. 1.1**). Stressoren lösen Reize im peripheren Nervensystem aus, die an das ZNS, insbesondere an das limbische System und den cerebralen Cortex, weitergeleitet werden. Dies führt zum ersten Schritt in der Hormonkaskade der HPA-Achse, der Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) durch Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) im Hypothalamus. CRH bewirkt wiederum die Freisetzung von adrenocorticotropinem Hormon (ACTH) durch corticotrope Zellen der Hypophyse in die Blutbahn. Erhöhte ACTH-Spiegel stimulieren die Nebennierenrinde zur Produktion und Ausschüttung

von Glucocorticoiden, die dann die oben beschriebenen Funktionen in Metabolismus,

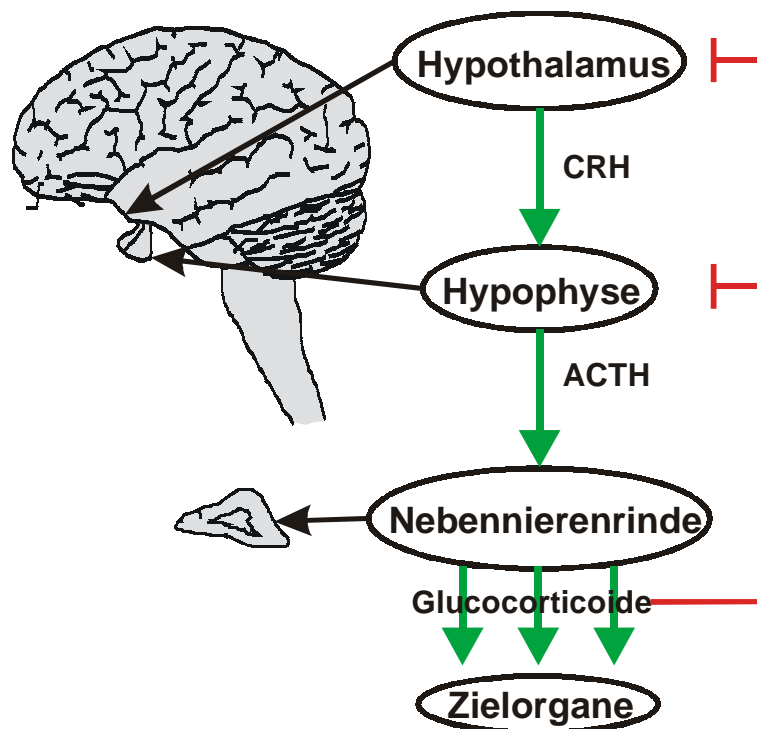


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der HPA-Achse. CRH, ausgeschüttet durch den Hypothalamus, stimuliert die Hypophyse zur Abgabe von ACTH. Dies bewirkt wiederum die Ausschüttung von GCs ins Blut. Das System ist mit einer negativen Rückkopplung ausgestattet: erhöhte GC-Spiegel inhibieren die Ausschüttung von CRH und ACTH.

Immunsystem und ZNS übernehmen. Ein negativer Rückkopplungsmechanismus in der HPA-Achse verhindert ein Überschreiten ihrer Aktivität. Ausschüttete GCs verringern die Freisetzung von CRH und ACTH und vermindern dadurch ihre eigene Synthese. Den Glucocorticoiden kommt also unter Stress einerseits die Rolle zu, alle Funktionen des Organismus auf diese Situation einzustellen, andererseits diesen Zustand auch zu begrenzen, indem sie ihre eigene Produktion limitieren.

1.2 Die Funktionen der Glucocorticoide werden durch die Corticosteroidrezeptoren vermittelt

1.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Corticosteroidrezeptoren

Nach den Ausführungen im ersten Abschnitt stellt sich die Frage, wie die GCs die vielfältigen Funktionen in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen ausüben können. Die Hormonantwort auf GCs wird durch zwei Typen von Corticosteroidrezeptoren (CRs) vermittelt, den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR, TypII-Rezeptor) und den Glucocorticoid-Rezeptor (GR, TypI-Rezeptor). Beide Rezeptoren sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren und gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren (NR). Sie sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich, unterscheiden sich hingegen hinsichtlich ihrer Pharmakologie und ihrer Verteilung im Organismus. Im ZNS ist der MR hauptsächlich im Hippocampus, im dorsolateralen Septum und in der Amygdala vorhanden (Sarrieau et al., 1984; Reul and De Kloet, 1986), während der GR im gesamten Hirn exprimiert wird, besonders aber im cerebralen Cortex, dem Hippocampus, dem Thalamus, dem PVN und dem Nucleus supraopticus des Hypothalamus (Reul and De Kloet, 1986; Kiss et al., 1988). Auch im restlichen Organismus ist der GR abundant, wohingegen der MR dort auf Gewebe wie Niere, Dickdarm und Speicheldrüse beschränkt ist (Monder, 1991). Die unterschiedliche Verteilung von MR und GR trägt wesentlich dazu bei, dass GCs gewebespezifisch wirken können.

Die Corticosteroidrezeptoren bestehen aus verschiedenen Domänen (**Abb. 1.2**), die allen nukleären Rezeptoren gemein sind. Die zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD) besteht aus zwei konservierten Zinkfingern und vermittelt die Bindung der Rezeptoren an spezifische DNA-Elemente, den Glucocorticoid-responsiven Elementen (GREs) (Berg, 1989). Am C-Terminus befindet sich die Liganden-Bindungsdomäne (LBD), die für die Hormonbindung und die Rezeptordimerisierung verantwortlich ist und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) enthält, das für die Translokation der Rezeptoren in den Zellkern notwendig ist (Tsai and O'Malley, 1994). In der LBD finden sich ausserdem Bindungsstellen für Hsp90 (engl.: heat shock protein 90) und die beiden Transaktivierungsdomänen tau2 (Milhon et al., 1997) und AF-2, wobei letztere mit Coaktivatoren interagiert (Ma et al., 1999; Kucera et al., 2002). Sowohl die Struktur der DBD als auch diejenige der LBD sind für MR

und GR sehr ähnlich, wohingegen der N-Terminus zwischen den beiden Rezeptoren stark variiert (Hollenberg et al., 1985). Beide enthalten jedoch N-terminal eine weitere Transaktivierungsdomäne AF-1 (Giguere et al., 1986; Truss et al., 1995). Die Bedeutung dieser Strukturen wird im Abschnitt 1.2.2 im Detail erläutert.



Abb. 1.2: Domänenstruktur der Corticosteroidrezeptoren. Der variable N-terminale Teil (gelb) enthält die AF-1 Domäne (orange). Die hochkonservierte DBD ist grün dargestellt. Am C-Terminus befindet sich die LBD (blaue Bereiche) mit der tau2 Domäne (hellblau) und der AF-2 Domäne (dunkelblau).

Trotz ihrer hohen Homologie unterscheiden sich MR und GR in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Der MR bindet nicht nur GCs, sondern mit ähnlicher Affinität auch eine andere Klasse von Steroidhormonen, die Mineralocorticoide. Ausserdem hat er eine zehnmal höhere Affinität zu natürlichen GCs als der GR. Es wird daher angenommen, dass der MR bei normalen Hormonmengen aktiviert wird, der GR hingegen erst bei erhöhten GC-Spiegeln, wie sie in Stresssituationen erreicht werden (De Kloet et al., 1993; Joels and De Kloet, 1994). Die unterschiedliche Affinität der beiden Rezeptoren ermöglicht eine differenzierte Hormonantwort, je nach physiologischem Status.

GCs sind wie alle Steroidhormone lipophil und können daher nahezu ungehindert die Zellmembran passieren und an ihre Rezeptoren binden, die sich im Cytoplasma befinden. Nach Hormonbindung und Translokation in den Kern aktivieren oder inhibieren die Rezeptoren die Transkription von Genen, indem sie an positive bzw. negative GREs binden. Der GR kann die Transkription bestimmter Gene zusätzlich inhibieren, indem er mit anderen Transkriptionsfaktoren z.B. AP-1 und NFκB wechselwirkt. Dieser Protein-Protein-„cross-talk“ ist besonders wichtig bei entzündungshemmenden Prozessen (De Bosscher et al., 2001). Während die Rezeptoren meistens als Monomere an nGREs binden (Radoja et al., 2000), erfordert die Bindung an positive GREs die Dimerisierung der Rezeptoren; sie können als GR-GR- oder MR-MR-Homodimere aber auch als GR-MR-Heterodimere binden, wobei jeder dieser Molekülkomplexe die Transkriptionsrate des Zielgens

unterschiedlich beeinflusst (Trapp et al., 1994). Z.B. aktivieren GR-Homodimere bei niedrigen Hormonkonzentrationen die Transkription gar nicht, MR-Homodimere nur moderat; die Kombination von GR und MR zeigt hingegen einen synergistischen Effekt, das heisst Heterodimere sind potente Aktivatoren von Genen bei geringen GC-Konzentrationen (Trapp et al., 1994). Durch die unterschiedlichen Funktionsweisen von GR und MR und deren Kombination wird die Antwort auf Glucocorticoide spezifisch und kann genau auf die gegebenen Umstände abgestimmt werden.

Der Organismus kann also auf Glucocorticoide differenziert reagieren, da die Hormonantwort durch zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt wird, die sich in ihrer Verteilung und Pharmakologie unterscheiden. Zusätzliche Möglichkeiten für Regulation und Modulation der Hormonantwort in der Zelle bestehen an verschiedenen Stellen der Signaltransduktion, wie im nächsten Abschnitt verdeutlicht werden soll.

1.2.2 Der Signalweg von GR und MR auf molekularer Ebene

Um in eine Konformation zu gelangen, in der sie Hormon binden können, durchlaufen die Rezeptoren einen Reifungsprozess, für den molekulare Chaperone und Co-Chaperone notwendig sind. Diese Klasse von Molekülen hilft bei der Proteinfaltung, indem sie inkorrekt gefaltete Proteine unter Energieaufwand entfalten und die Aggregation ungefalteter Proteine verhindern. Bei Hitzeschock kommt es zu vermehrter Protein-Aggregation und daher erhöhter Expression von Chaperonen, die deswegen auch Hitzeschock-Proteine (Hsps) genannt werden. Die Reifung der Steroidrezeptoren läuft in mehreren Schritten ab (Kimmins and MacRae, 2000) (**Abb.**

1.3 obere Hälfte): (1) Hsp70 bindet zusammen mit ATP an das Rezeptormolekül, die darauffolgende Bindung von Hsp40 bewirkt, dass ATP hydrolysiert und der Rezeptor partiell gefaltet wird. (2) Hop (engl.: hsp-organising protein) bindet in den Komplex und vermittelt dadurch die Bindung zweier Hsp90-Moleküle. Dabei entsteht ein intermediärer Rezeptorkomplex. (3) Hop und Hsp40 werden durch p23 und einen sogenannten Targetmodulator (TM) wie FKBP51, FKBP52 oder CyP40 ersetzt. Es entsteht der reife Rezeptorkomplex, der nun bereit ist, hoch affin Hormon zu binden.

Die Bindung von Hormon an den Rezeptor bewirkt, dass das nukleäre Lokalisations-Signal (NLS), das durch den Komplex maskiert war, an die Oberfläche tritt. Damit kann der Rezeptor vom Cytoplasma in den Kern transportiert werden (Ylikomi et al.,

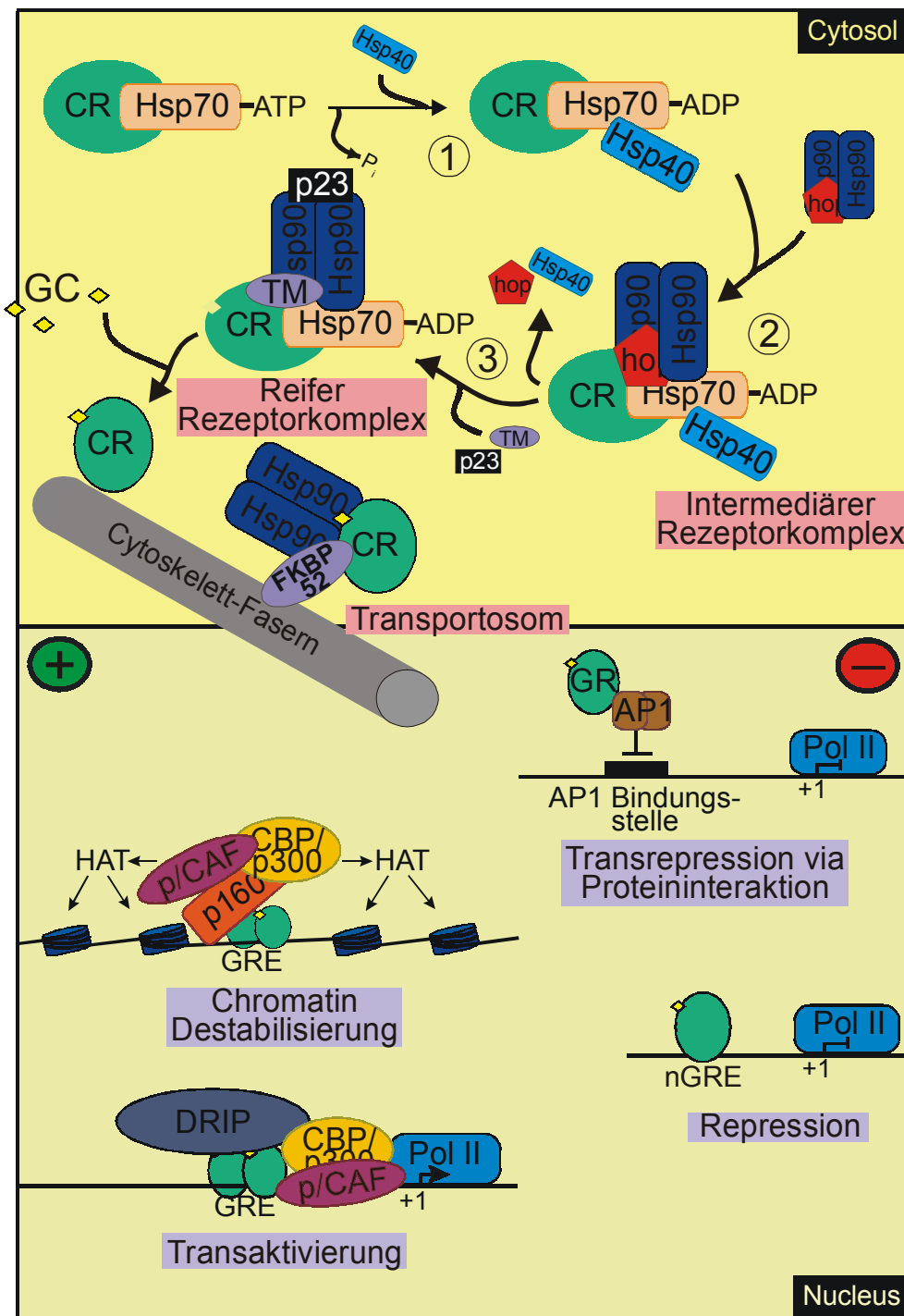


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des GC Signalwegs. Der Rezeptor durchläuft im Cytosol einen Reifungsprozess, für den molekulare Chaperone notwendig sind (s. Text). Nach Hormonbindung wird er mittels Transportosom entlang von Cytoskelett-Fasern in den Kern transportiert. Dort wird die Transkription bestimmter Zielgene entweder aktiviert oder inhibiert. Für die Transaktivierung sind Coaktivatoren nötig, die das Chromatin destabilisieren und die DNA-Polymerase (Pol II) aktivieren. Repression findet statt, wenn der Rezeptor an negative (n)GREs bindet. Die CRs können ausserdem mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1) interagieren und so deren Zielgene inaktivieren (Transrepression).

1992) (**Abb. 1.3 Mitte**). Es ist nicht klar, ob sich der Rezeptor dabei vollständig vom Chaperonkomplex löst oder ob Teile des Komplexes zum gerichteten Transport in den Kern beitragen. Generell ist über die Translokation noch relativ wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass sie entlang des Cytoskeletts erfolgt. Wird dieses jedoch zerstört, transloziert zumindest der GR immer noch in den Kern, wahrscheinlich durch Diffusionsprozesse, allerdings ist die Translokation verlangsamt (Galigniana et al., 1998). Es wurde vorgeschlagen, dass für den Transport entlang des Cytoskeletts ein sogenanntes Transportosom verantwortlich ist, das sich mindestens aus Hsp90, FKBP52 und dem Rezeptor zusammensetzt (Smith, 1993). Der Transport des Rezeptors in den Kern kann durch pharmakologische Inhibierung von Hsp90 gestört werden, was darauf hin deutet, dass der Transport Hsp90-abhängig funktioniert (Czar et al., 1997; Galigniana et al., 1998). Für FKBP52 wurde gezeigt, dass es über Dynamitin an Dynein, eine Komponente des Cytoskeletts, bindet (Czar et al., 1994). Daher könnte es als Verbindungsglied zwischen dem Transportosom und dem Cytoskelett dienen (Pratt et al., 1999).

Im Kern angekommen binden GR und MR an spezifische Promotor-Sequenzen, die Glucocorticoid-responsiven Elemente (GREs) (**Abb. 1.3**, unterer Teil). Durch die DNA-Bindung wird die Transkriptionsrate bestimmter Gene (Zielgene) entweder erhöht (Transaktivierung) oder reduziert (Transrepression). Deswegen teilt man die GC-responsiven Promotorsequenzen in positive GREs und negative nGREs ein. Erstere findet man z.B. im humanen Metallothionein (MT)-Promotor und im viralen MMTV (engl.: mouse mammary tumour virus)-Promotor, letzteren unter anderem im Proopiomelanocortin (POMC)-Promotor (Beato et al., 1989). Je nachdem, ob die Transkription aktiviert oder inhibiert wird, rekrutiert der Rezeptor sogenannte Coaktivatoren bzw. Corepressoren. Erstere bewirken die Destabilisierung des Chromatins durch Acetylierung von Histonen (durch Histone-Acetyl-Transferasen, HAT) und die Aktivierung der basalen Transkriptionsmaschinerie, letztere stabilisieren die Chromatinstruktur durch Deacetylierung der Histone (Collingwood et al., 1999). Beispiele von Coaktivatoren und -repressoren sind in **Tabelle 1.1** zusammengestellt. Einige davon sind Zelltyp- und Promotor-spezifisch und werden nur von bestimmten Rezeptoren aktiviert, andere agieren sehr allgemein.

Name	Funktion	Spezifität	Interaktion mit	Literatur
Coaktivatoren				
BRG1 (SWI/SNF)	<ul style="list-style-type: none"> ATP-abhängige Restrukturierung von Chromatin Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie 	GR, ER, RAR	AF-1	(Wallberg et al., 2000)
P/CAF (ADA/SAGA)	<ul style="list-style-type: none"> HAT-Aktivität Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie 	GR, AR, ER, RAR/RXR	AF-1, CBP/p300, p160	(Ogryzko et al., 1998; Rosenfeld and Glass, 2001)
CBP/p300	<ul style="list-style-type: none"> HAT-Aktivität 	Diverse Transkriptionsfaktoren	AF-1, AF-2 via p160	(Rosenfeld and Glass, 2001; Kobayashi et al., 2000)
p160-Familie	<ul style="list-style-type: none"> HAT-Aktivität 	Diverse Transkriptionsfaktoren	AF-2	(Rosenfeld and Glass, 2001)
DRIP (TRAP/ARC)	<ul style="list-style-type: none"> Koordination von AF-1 und AF-2 	GR, TR, Vitamin D-Rezeptor	AF-1, AF-2	(Hittelman et al., 1999)
Corepressoren				
SHP		Nukleäre Rezeptoren		(Borgius et al., 2002)
RIP140	<ul style="list-style-type: none"> Rekrutierung von Histon-Deacetylasen 	Nukleäre Rezeptoren		(Windahl et al., 1999)

Tabelle 1.1: Überblick über bekannte Coaktivatoren und Corepressoren und ihre Funktionen. Verwendete Abkürzungen: AF, Aktivierungsfunktion; AR, Androgenrezeptor; ER, Östrogenrezeptor; HAT, Histon-Acetyltransferase; RAR, engl.: retinoic acid receptor; RXR, engl.: retinoid X receptor; TR, Thyroidhormonrezeptor.

Die Signaltransduktion der Corticosteroidrezeptoren ist also ein hochgradig kontrollierter Vorgang, der durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert und modifiziert werden kann. Dadurch kann die Hormonantwort der jeweiligen Situation optimal angepasst werden.

1.2.3 GC-Resistenz

Da die Glucocorticoide vitale Funktionen im Körper übernehmen, ist die komplette Resistenz gegenüber dieser Hormonklasse tödlich (Chrousos et al., 1993). Partielle Resistenz hingegen ist ein relativ häufiges Problem. Sie tritt oft bei Menschen auf, die auf chronische GC-Behandlung angewiesen sind, weil sie z.B. unter Asthma, Rheuma oder anderen Autoimmunkrankheiten leiden. Sie ist aber auch bei einer ganzen Reihe von anderen Krankheiten von zentraler Bedeutung (DeRijk and Sternberg, 1997). Ein wichtiges Beispiel dafür sind die depressiven Störungen, die dritthäufigste Todesursache in Europa und den USA. Depression geht in den meisten Fällen mit einer Hyperaktivität der HPA-Achse einher (Holsboer and Barden, 1996), was auf eine fehlerhafte negative Rückkopplung zurückgeführt wird (Holsboer, 2000). Diese wird, wie oben beschrieben, hauptsächlich durch den GR vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Veränderungen in der HPA-Achse kausal für depressive Störungen sein könnten; z.B. zeigen Tiere mit HPA-Achsen-Hyperaktivität ähnliche Verhaltensmuster wie depressive Menschen (Owens and Nemeroff, 1993), und die erfolgreiche Behandlung mit Antidepressiva bewirkt bei vielen Patientinnen und Patienten auch eine Normalisierung der HPA-Achsenaktivität (Holsboer et al., 1982). Findet keine Normalisierung statt, erhöht sich das Risiko eines erneuten depressiven Schubs (Zobel et al., 1999).

Auf molekularer Ebene kann GC-Resistenz verschiedene Ursachen haben. Es sind Fälle bekannt, bei denen die Rezeptorgene mutiert sind, und dadurch die Hormonbindung vermindert ist (Kino and Chrousos, 2001). Ebenfalls beschrieben ist, dass eine Splice-Variante des GRs, der GR β , als dominant negative Form wirken und so Hormonresistenz hervorrufen kann (Schaaf and Cidlowski, 2003a). Eine weitere Möglichkeit, die auch im Zusammenhang mit Depression diskutiert wird, ist eine verringerte Anzahl der Rezeptoren. Tatsächlich wurden in bestimmten Hirnarealen depressiver Menschen Veränderungen der Corticosteroidrezeptoren beschrieben, sowohl auf mRNA- (Webster et al., 2002) wie auch auf Proteinebene (De Kloet, 2000). Die Verringerung der Expression könnte durch homologe

Herabregulierung der Rezeptoren, das heisst durch Verminderung der eigenen Rezeptoren durch das Hormon zustande kommen (Schaaf and Cidlowski, 2003a). Wie es dazu kommt, ist noch nicht restlos geklärt; es gibt Hinweise darauf, dass das Rezeptorgen selbst nGREs trägt; es wurde aber auch gezeigt, dass die Anwesenheit von Hormon die Stabilität der Rezeptor-mRNA und die des Proteins vermindert (Schaaf and Cidlowski, 2003a). Hormonresistenz kann auch durch verminderte oder erhöhte Funktion von Cofaktoren (molekulare Chaperone, Coaktivatoren, Corepressoren) zustande kommen, die – wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben – essentiell für die Signaltransduktion der Rezeptoren sind. Es ist daher von grosser Bedeutung, das Zusammenspiel von Rezeptor und Cofaktoren genau zu verstehen. Viele Rezeptor-regulierende Faktoren sind bereits bekannt, es gibt aber immer noch zahlreiche offene Fragen zum Verständnis der CR-Signalwege. Deswegen ist es nicht nur wichtig, die Funktion der bekannten Proteine weiter aufzuklären, sondern sich auch auf die Suche nach neuen CR-regulierenden Faktoren zu machen.

1.3 Hormonresistente Zellen als Hilfsmittel zur Entschlüsselung eines Rezeptorsignalwegs

Die Analyse hormonresistenter Zelllinien hat zur Entdeckung von einer Reihe wichtiger Faktoren in Rezeptorsignalwegen geführt. Für die vorliegende Arbeit wurden GC-resistente Zellen erzeugt und analysiert, um neue Proteine zu entdecken, die für die Funktion des Glucocorticoidrezeptors wichtig sind. Der Fokus wurde auf den GR und nicht auf den MR gelegt, weil er bei erhöhten GC-Spiegeln aktiviert wird und damit für wichtige Syndrome wie Stress und depressive Störungen bedeutender ist. In diesem letzten Abschnitt werden frühere Analysen von GC-resistenten Zellen erläutert und zum Schluss der Ansatz dieser Arbeit erklärt.

1.3.1 Auf der Suche nach Faktoren, die den GR-Signalweg beeinflussen

In der Vergangenheit wurden diverse Ansätze verfolgt, um den GR-Signalweg zu entschlüsseln. Die systematische Suche (screening) nach Proteinen, die mit dem GR interagieren, wurde prinzipiell auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Die Mehrzahl der Screens basierte auf physischer Wechselwirkung der jeweiligen Faktoren mit dem GR, z.B. auf Co-Immünpräzipitierung oder Yeast-two-hybrid-Systemen (Göttlicher et al., 1996; De Martino et al., 2004; Hong et al., 1996; Wakui

et al., 1997; Hittelman et al., 1999; Hulkko et al., 2000; Yang et al., 2000; De Martino et al., 2004). In einem yeast-two-hybrid-Screen wurde beispielsweise der Coaktivator GRIP-1 gefunden, der zur Familie der p160 Proteinen gehört (s. **Tabelle 1.1**) (Hong et al., 1996).

Beim anderen Ansatz handelt es sich um funktionelle Screens, die den Vorteil haben, dass auch Proteine gefunden werden können, die die Rezeptorfunktion beeinflussen, ohne direkt oder indirekt an diesen zu binden. Die beiden ältesten dieser Arbeiten beschrieben Methoden zur Isolierung hormonresistenter Zellen, fanden aber keine Ursachen für die Resistenz. Der eine Screen wurde mit einer Ratten-Hepatomezelllinie durchgeführt, die mit dem MMTV (engl.: mouse mammary tumour virus) infiziert wurde. Wie in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, ist der MMTV-Promotor GC-induzierbar. In der verwendeten Zelllinie wurde unter anderem das virale Oberflächenprotein gp52 nach Hormongabe exprimiert. Hormonresistente Zellen wurden isoliert, indem ein an GFP (engl.: green fluorescent protein) gekoppelter Antikörper gegen gp52 verwendet, und die Zellen durch FACS (engl.: fluorescence activated cell sorting) sortiert wurden (Grove et al., 1980). Die zweite Studie basierte ebenfalls auf einer MMTV-infizierte Zelllinie, allerdings handelte es sich dabei um Maus-T-Lymphosarcoma-Zellen. Diese Zellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass GC-Gabe zur Inhibition der Proliferation und schliesslich zur Zelllyse führt. Nach Selektion in hormonhaltigem Medium konnten Zellen isoliert werden, die nicht mehr hormonresponsiv waren (Rabindran et al., 1987).

1995 wurden gleich zwei Studien veröffentlicht, in denen durch chemische Mutagenese hormonresistente Zellen geschaffen und danach analysiert wurden. In der einen wurden Maus-T-Lymphoma-Zellen verwendet, die normalerweise durch GC-Gabe sterben. Nach der Mutagenese konnten Klone isoliert werden, die die Hormonbehandlung überlebten. Durch deren Analyse wurden GR-Mutationen gefunden, aus denen geschlossen werden konnte, welche Aminosäuren für die GR-Funktion essentiell sind (Lee et al., 1995). Für die andere Studie wurde ein Neomycinresistenzgen unter der Kontrolle von negativen GREs in eine Maus-Hypophysentumorzelllinie eingeführt. Verabreichung von Neomycin in Kombination mit GCs inhibierte das Wachstum von nicht mutierten Zellen, nur nach Mutagenese konnten Klone überleben (Harrison et al., 1995). Eine weiterführende Analyse, die zur Identifikation von Mutationen im GR oder anderen Faktoren geführt hätte, blieb aber auch in dieser Studie aus.

Der neueste funktionelle Screen wurde nicht in Säugerzellen sondern in Hefe durchgeführt und beruhte nicht auf Hormonresistenz, sondern auf erhöhter Rezeptoraktivität. Ein Hefestamm, der nur unter Zugabe von hohen Hormonmengen wachsen konnte, wurde mit UV-Licht zufällig mutiert und in Selektionsmedium mit wenig Hormon gehalten. Die überlebenden Klone zeigten eine erhöhte Hormonantwort. Die Untersuchung dieser Klone resultierte in der Identifikation von sogenannter Liganden-Effekt-Modulatoren, LEM1-6, wobei es sich bei LEM 6 um einen bekannten GR-Coaktivator handelte (Knutti et al., 2000; Sitcheran et al., 2000). Die obigen Beispiele zeigen, dass zwar schon einige Studien durchgeführt wurden, um systematisch nach Cofaktoren der GR-Signaltransduktion zu suchen, das Potential solcher Screens aber noch nicht ausgeschöpft wurde. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer funktioneller Screen durchgeführt.

1.3.2 Das Konzept dieser Arbeit

Für die vorliegende Studie wurde ein Screen adaptiert, der bis dato nicht für nukleäre Rezeptoren durchgeführt wurde, aber einen Beitrag zur Aufklärung des Interleukin-1-Rezeptor-Signalwegs geleistet hat (Li et al., 1999). Die Arbeit wurde in HeLa Zellen, einer humanen Zervix-Adenocarcinom-Zelllinie, durchgeführt. Als Selektionsmarker diente die Herpesvirus Thymidinkinase (TK), die das Medikament Ganciclovir in ein zytotoxisches Nukleosid analogon verwandelt, und so den Zelltod bewirkt (Cheng et al., 1983). Das TK-Gen wurde unter die Kontrolle des MMTV-Promotors gestellt, so dass Ganciclovir nur in Kombination mit Hormon tödlich ist. Es wurde Dexamethason (Dex), ein synthetisches Glucocorticoid verwendet, weil es spezifisch den GR aktiviert, aber keine Wirkung auf den MR hat. Wie in früheren Screens wurden die Zellen chemisch mutiert. Für die Analyse der hormonresistenten Zellen wurde ein proteomischer Ansatz gewählt: die Proteine der verschiedenen Klone wurden auf 2D-Gelen aufgetrennt und verglichen, und die differentiell exprimierten Faktoren wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Das Prinzip des Screens ist in **Abb. 1.4** skizziert. Mit diesem Konzept sollten neue GR-Regulatoren identifiziert werden, die zur pathologischen Rezeptorresistenz beitragen könnten.

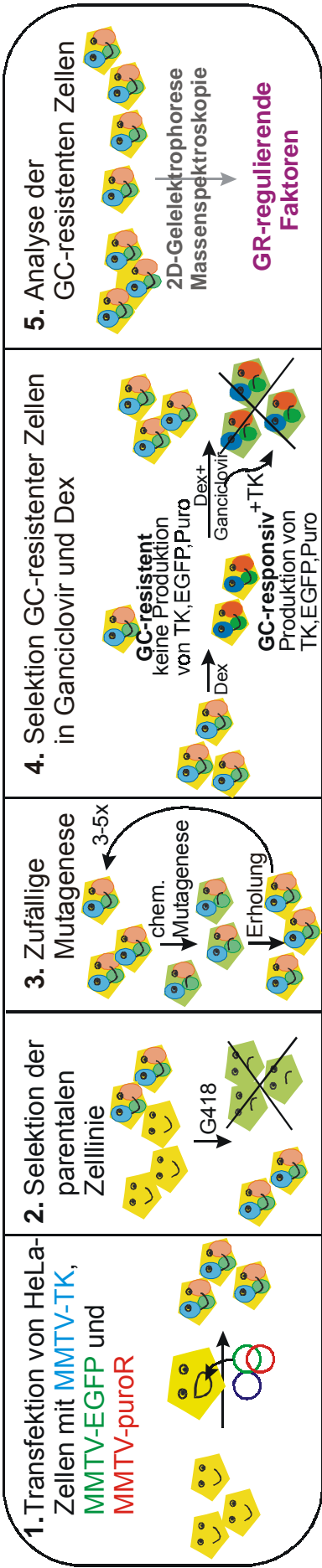


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des verwendeten Screens. 1. HeLa-Zellen werden mit dem MMTV-TK-Plasmid transfiziert. Als Kontrollen werden auch GFP und eine Puromycinresistenz (puroR), beide unter dem MMTV-Promotor, cotransfiziert. 2. Die Selektion der Zellen, die diese 3 Plasmide stabil integriert haben, wird mit dem Neomycinanalogon G418 durchgeführt, da das TK-Plasmid zusätzlich eine Neomycinresistenz trägt. 3. Die Zellen werden 3-5 Runden chemischer Mutagenese unterworfen. 4. Die Selektion findet in Dexamethason (Dex)- und ganciclovirhaltigem Medium statt. Zellen, die nur wenig TK exprimieren, können überleben. 5. Hormonresistente Klone werden mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie analysiert.

2. Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamidlösung für Minigele (37,5% mit 1% Bisacrylamid)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Adenosin 5'-Triphosphat	Sigma (St. Louis, USA)
AG 1-X8 Resin	Bio-Rad Laboratories (München)
Agarose SeaKem	Biozym (Oldendorf)
Aktivkohle	Sigma (St. Louis, USA)
3-Aminophthahydrazid	Fluka (Buchs)
Ammoniumperoxidsulfat	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
100x Antibiotic-Antimycotic	Invitrogen (Karlsruhe)
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences (Heidelberg)
20% Biolyte	Bio-Rad (München)
Bisbenzimid	Sigma (St. Louis, USA)
Borsäure	Calbiochem (San Diego, Kalifornien)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	Sigma (St. Louis, USA)
[α - ³² P]dCTP	Amersham (Freiburg)
Chloroform	Sigma (St. Louis, USA)
Colloidal Coomassie Brilliant Blue G	Sigma (St. Louis, USA)
Comassie Serva Blue R	Serva (Heidelberg)
Complete (Proteaseinhibitoren-Gemisch)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Coumarinsäure	Sigma (St. Louis, USA)
Cytochalasin B	Sigma (St. Louis, USA)
Desoxynukleosidtriphosphat	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Dexamethason	Sigma (St. Louis, USA)
Dextran T70	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
DEPC	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
DTT	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
	Bio-Rad (München) für 2D-Gele
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Medium w/o Phenol red	Invitrogen (Karlsruhe)

Material

10x EBSS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Sigma (St. Louis, USA)
Einbettmedium Pro taps Mount Fluor Quartett	Immundiagnostika (Berlin)
ENU Isopack ^R	Sigma (St. Louis, USA)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs)
Fludrocortison Acetat	Sigma (St. Louis, USA)
Foetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
G418	Invitrogen (Karlsruhe)
Ganciclovir	Sigma (St. Louis, USA)
Gelantine	Sigma (St. Louis, USA)
Hefe Extrakt	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
50% Hybri Max-PEG-Lösung	Sigma (St. Louis, USA)
ICR191	Sigma (St. Louis, USA)
Iodacetamid	Bio-Rad (München)
IPTG	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Kaleidoskop prestained Standards	Bio-Rad Laboratories (München)
Kodak GBX Developer	Sigma (St. Louis, USA)
Kodak GBX Fixer	Sigma (St. Louis, USA)
Lamda-DNA HindIII Digest	NEB (Frankfurt am Main)
LB broth	Sigma (St. Louis, USA)
Low melting Agarose	Bio-Rad (München)
Luciferin	Roche Diagnostics (Mannheim)
³⁵ S-Methionin	Amersham (Freiburg)
Milchpulver Rapidlait	Migros (Schweiz)
MOPS	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
MTT	Sigma (St. Louis, USA)
NP-40	Sigma (St. Louis, USA)
10x PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
TRITC-Phalloidin	Sigma (St. Louis, USA)
Phenol	Sigma (St. Louis, USA)
PhiX174 DNA-HaeIII Digest	NEB (Frankfurt am Main)
PMA	Sigma (St. Louis, USA)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Precision Plus Protein Standard	BioRad (München)

Material

Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma (St. Louis, USA)
Puromycin	Sigma (St. Louis, USA)
RapidHyb-Puffer	Amersham (Freiburg)
Ribonuclease	Sigma (St. Louis, USA)
RNASE FREE	CLP (Grossbritannien)
Rnasin	Promega (Mannheim)
Sequencing grade Trypsin	Promega (Mannheim)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs)
100 mM Sodium Pyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Stripping-Puffer	Pierce (Bonn)
TEMED	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
10x TGS-Puffer	Bio-Rad (München)
Tris	Riedel-de Haen (Seelze)
Triton X-100	Sigma (St. Louis, USA)
10x Trypsin-EDTA Solution	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypton BD	Biosciences (Heidelberg)
TWEEN20	Sigma (St. Louis, USA)
X-Gal	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Zeocin	Invivogen (San Diego, USA)

Chemikalien, die hier nicht vermerkt sind, stammen von der Firma Merck (Darmstadt).

2.2 Enzyme

CIP	NEB (Frankfurt am Main)
M-MuLV RT	NEB (Frankfurt am Main)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt am Main)
	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
Pepstatin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pwo-DNA Polymerase	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Taq-DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Polynukleotidkinase (PNK)	Roche Diagnostics (Mannheim)

2.3 Antikörper

Primäre Antikörper			
Name	Verd.	Isotyp	Firma
Anti-Actin I-19	1:2000	Goat IgG	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-c-Jun	1:500	Mouse IgG	BD Bioscience (New Jersey, USA)
Anti-Cofilin 1	1:1000	Rabbit IgG	Cytoskeleton Inc. (Denver, USA)
Anti-P-Cofilin (Ser3)-R	1:3000	Rabbit IgG	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-FLAG M2	1:2000	Mouse IgG	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-GFP B-2	1:2000	Mouse IgG2a	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-GR H-300	1:2000	Rabbit IgG	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-Hsp90 H-114	1:2000	Rabbit IgG	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Sekundäre Antikörper			
Name	Verd.	Wirtstier	Firma
Anti-Goat IgG	1:2000	Esel	Santa Cruz (Kalifornien, USA)
Anti-Mouse IgG	1:2000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-Rabbit IgG	1:2000	Ziege	Sigma (St. Louis, USA)

2.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Standard-Bakterien und -Zellen		
Name	Eigenschaften	Herkunft/ATCC
E.coli DH5 α	Verwendung für Plasmidisolierung	Invitrogen (Karlsruhe)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	CCL 1573
HeLa	Humane Zervix-Adenocarcinoma-Zellen	CC L2
Sk-N-MC	Humane Neuroblastoma-Zellen	HTB10
Generierte Zelllinien		
Name	Eigenschaften	Ursprungslinie
MTV-luc	Stabil integriertes MTV-luc, erhalten von A. Abel	HeLa
Parental1	Stabil integriertes MMTV-TK, MMTV-EGFP, MMTV-puro ^R -Plasmid	HeLa
Mut1	Entstanden durch zufällige Mutagenese mit	Parental1

	ICR191, Dex-resistent	
Mut2	Entstanden durch zufällige Mutagenese mit ICR191, Dex-resistent	Parental1
Mut3	Entstanden durch zufällige Mutagenese mit ENU, Dex-resistent	Parental1
s6	Fusionslinie, Dex-resistent	Mut1, MTV-luc
c1	Stabil integriertes pRK5cof-Plasmid	HeLa

2.5 Plasmide

Erhaltene Plasmide		
Name	Eigenschaften	Referenz
Coll-luc	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Collagenasepromotorregion -573 bis +63 treibt Luciferasegen ▪ Ampicillin-Resistenz 	Erhalten von S. Heck
GFP-GR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebener N-terminal mit EGFP fusionierter humaner GR ▪ Kanamycin-Resistenz 	Wochnik et al., 2004
MTV-luc	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV-getriebenes Luciferasegen ▪ Ampicillin-Resistenz 	Hollenberg und Evans, 1988
6x NF κ B-luc	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6NFκB-responsive Elemente treiben Luciferasegen ▪ Ampicillin-Resistenz 	Erhalten von S. Heck
pCMV- β Gal	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebene β-Galaktosidase ▪ Ampicillin-Resistenz 	Stratagene (La Jolla, USA)
pEGFP-C1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes EGFP-Gen ▪ Vewendet für Klonierung von Genen mit N-terminal fusioniertem EGFP ▪ Kanamycin-Resistenz 	Clontech (San Jose, USA)
pPNT	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enthält Herpesvirus TK ▪ Neomycin-Resistenz 	Erhalten von W. Wurst
pRK5SV40MCS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-Promotor ▪ Multiple Klonierungsstelle 	Wochnik et al., 2004

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampicillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	
pRK7-GR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SV40-getriebener humaner GR ▪ Ampicillin-Resistenz 	Erhalten von D. Spengler Hollenberg et al., 1985
pRK7-FLAG-GR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SV40-getriebener N-terminal mit FLAG-Epitop fusionierter humaner GR ▪ Ampicillin-Resistenz 	Wochnik et al., 2004
pGEX-GR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mit GST-Epitop fusionierter GR 	Erhalten von D. Spengler
Klonierte Plasmide (Klonierungsstrategien s. 3.3.1)		
Name	Eigenschaften	Bestandteile
MMTV-EGFP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV-getriebenes EGFP-Gen ▪ Kanamycin-Resistenz ▪ Neomycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV aus MTV-luc ▪ „Backbone“ pEGFP-C1
MMTV-puro ^R	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV-getriebene Puromycinresistenz ▪ Ampicillin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV aus MTV-luc ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
MMTV-TK	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMTV-getriebene Herpesvirus TK ▪ Kanamycin-Resistenz ▪ Neomycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TK aus pPNT ▪ MMTV aus MTV-luc ▪ „Backbone“ pEGFP-C1
pRK5cof	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Cofilin 1 ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cofilin 1 von cDNA amplifiziert ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5cofflag	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Cofilin mit C-terminalem FLAG-Epitop ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cofilin-flag amplifiziert von pRK5cof ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5cofS3A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Cofilin mit Alanin statt Serin an Rest 3 ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CofilinS3A amplifiziert von pRK5cof ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5cofS3D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Cofilin mit Aspartat statt Serin an Rest 3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CofilinS3D amplifiziert von pRK5cof

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5cof Δ NL	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Cofilin ohne Reste 30-34 ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CofΔNL amplifiziert von pRK5cof ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pEGFPcof	<ul style="list-style-type: none"> ▪ N-terminal EGFP-fusioniertes Cofilin ▪ Zeocin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cofilin mit XhoI und BamHI ausgeschnitten aus pRK5cof ▪ „Backbone“ pEGFP-C1
pEGFPcof Δ NL	<ul style="list-style-type: none"> ▪ N-terminal EGFP-fusioniertes CofΔNL ▪ Zeocin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CofΔNL mit XhoI und BamHI ausgeschnitten aus pRK5cofΔNL ▪ „Backbone“ pEGFP-C1
pRK5hsp27	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Hsp27 ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hsp27 von cDNA amplifiziert ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5ret	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Reticulocalbin ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reticulocalbin von cDNA amplifiziert ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS
pRK5thio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CMV-getriebenes Thioredoxin ▪ Ampizillin-Resistenz ▪ Puromycin-Resistenz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Thioredoxin von cDNA amplifiziert ▪ „Backbone“ pRK5SV40MCS

2.6 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden alle von MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind blau, eingeführte Mutationen rot unterlegt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die PCRs unter

Material

Standardbedingungen (vgl. Abschnitt 3.2.1.3) mit der angegebenen Annealingtemperatur durchgeführt.

Name	5'-3'-Sequenz	Verwendung	PCR-Bedingungen
MTVLTR5 (5'-Primer)	TCT GAA TTC ATT AAT CTC TTA CAA GCC GCA TCG A	▪ Amplifizierung des MMTV-Promotors, Einführung einer AseI-Schnittstelle	58°C
MTVLTR3 (3'-Primer)	TGA GCT AGC TGG CCA TCT GCC GCA GTC GGC CG	▪ Amplifizierung des MMTV-Promotors, Einführung einer NheI-Schnittstelle	58°C
MTVPuro5 (5'-Primer)	TCT AAG CTT CTC TTA CAA GCC GCA TCG A	▪ Amplifizierung des MMTV-Promotors, Einführung einer HindIII-Schnittstelle	58°C
MTVPuro3 (3'-Primer)	TGA CTG CAG CTG CCG AGT CGG CCG	▪ Amplifizierung des MMTV-Promotors, Einführung einer PstI-Schnittstelle	58°C
Tkstart (5'-Primer)	TGG CTC GAG ATG GCT TCG TAC CCC TGC	▪ Nachweis von TK in RT-PCR	48°C, 0,5 mM MgSO ₄
TK2 (3'-Primer)	CCT GCA GAT ACC GCA CC	▪ Nachweis von TK in RT-PCR	48°C, 0,5 mM MgSO ₄
GAPDH5 (5'-Primer)	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	▪ Nachweis von GAPDH in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52-60°C
GAPDH3 (3'-Primer)	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	▪ Nachweis von GAPDH in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52-60°C
MThumanfor (5'-Primer)	ATG GAT CCC AAC TGC TCC TGC G	▪ Nachweis von MT-I in RT-PCR	59°C

Material

MThumanrev (3'-Primer)	AGG GCT GTC CCA ACA TCA GGC	▪ Nachweis von MT-I in RT-PCR	59°C
GFPGRupstr (5'-Primer)	ATG CTC GAG CTA TGG ACT CCA AAG AAT CA	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung zusammen mit hGRNL-2 oder GRcDNA8	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
GFPGRdown (3'-Primer)	ATC GGT ACC TCA CTT TTG ATG AAA CAG A	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
hGRNL-1 (5'-Primer)	TCC ACG GCA TCG ATA AAA TTC GTA GAA AAA AC	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung zusammen mit GRcDNA7 oder GFPGRdown	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
hGRNL-2 (3'-Primer)	TCC TTT TAT GTT GTT GTT TGT TTT TCG A	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
hGRNL-4 (3'-Primer)	TCC CCT TAG GAA CTG AAG AGA GAA	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
GRcDNA7 (3'-Primer)	CAA AAC CTC TAC AGG ACA	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
GRcDNA8 (3'-Primer)	TCC GGT AAA ATG AGA GGC TT	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
GRcDNA9 (5'-Primer)	TTC ATT CCT TTT GGA AGG AAA	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung zusammen mit hGRNL-2	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step
GRcDNA10 (5'-Primer)	GGATTTGGAGTTT TCTTCTTCTG	▪ Amplifizierung von GR-Fragment für Sequenzierung zusammen	Touch-down-PCR 60°C, -0,5°C/step

Material

		mit hGRNL-4	
Actinbetafor (5'-Primer)	TCC CTC GAG ATG GAT GAT GAT ATC GCC GC	▪ Amplifizierung von Actin, Einführung einer XhoI- Schnittstelle	52°C
Actinbetarev (3'-Primer)	TCC GGA TCC CTA GAA GCA TTT GCG GTG GA	▪ Amplifizierung von Actin, Einführung einer BamHI- Schnittstelle	52°C
ActinbetaG13R (5'-Primer)	TCC CTC GAG ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC GTC GTC GAC AAC CGC TCC GGC ATG	▪ Amplifizierung von ActinG13R, Einführung einer XhoI-Schnittstelle	52°C
Cofilin for (5'- Primer)	TCC CTC GAG ACA TGG CCT CCG GTG TGG	▪ Amplifizierung von Cofilin, Einführung einer XhoI- Schnittstelle ▪ Nachweis von Cofilin in RT- PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
Cofilin rev (3'- Primer)	TCC GGA TCC TCA CAA AGG CTT GCC CTC C	▪ Amplifizierung von Cofilin, Einführung einer BamHI- Schnittstelle ▪ Nachweis von Cofilin in RT- PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
Cofilinflag (3'- Primer)	TCC GGA TCC TCA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAA AGG CTT GCC CT	▪ Amplifizierung von Cofilin mit C-terminalem FLAG, Einführung einer BamHI- Schnittstelle	52°C
Cofilin S3A (5'- Primer)	TCC CTC GAG ACA TGG CCG CCG GTG TGG	▪ Amplifizierung von S3A- Cofilin, Einführung einer XhoI-Schnittstelle	52°C

Material

Cofilin S3D (5'-Primer)	TCC CTC GAG ACA TGG CCG ACG GTG TGG	▪ Amplifizierung von S3D-Cofilin, Einführung einer XhoI-Schnittstelle	52°C
CofNLfor (5'-Primer)	AGA GGA GGT GGC GGT GCT	▪ Amplifizierung von cofΔNL	52°C
CofNLrev (3'-Primer)	AGC ACC GCC ACC TCC TCT	▪ Amplifizierung von cofΔNL	52°C
hsp27 for (5'-Primer)	CAC GAG GAG CGG CAG GAC GAG	▪ Nachweis von Hsp27 in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
hsp27rev (3'-Primer)	CAG TGG CGG CAG CAG GGG TGG	▪ Nachweis von Hsp27 in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
hsp27xhofor (5'-Primer)	TCC CTC GAG ATG ACC GAG CGC CGC GT	▪ Amplifizierung von Hsp27, Einführung einer XhoI-Schnittstelle	52°C
hsp27hindrev (3'-Primer)	TCC AAG CTT CAG TGG CGG CAG CAG GGG TGG	▪ Amplifizierung von Hsp27, Einführung einer HindIII-Schnittstelle	52°C
Reticulocalbin for (5'-Primer)	CAA GGA CGG GAA GTT AGA CAA AGA TGA	▪ Nachweis von Reticulocalbin in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
Reticulocalbin rev (3'-Primer)	CCA CTC ACC TTC TGA AGA ACA GGG C	▪ Nachweis von Reticulocalbin in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden	52°C
Reticuloxhofor (5'-Primer)	TCC CTC GAG ATG GCG CGC GGT GGC	▪ Amplifizierung von Reticulocalbin, Einführung einer XhoI-Schnittstelle	52°C
Reticulohindrev (3'-Primer)	TCC AAG CTT CCA CTC ACC TTC TGA	▪ Amplifizierung von Reticulocalbin, Einführung	52°C

	AGA ACA GGG C	einer HindIII-Schnittstelle	
Thioredoxin for (5'-Primer)	TCC CTC GAG ATG GTG AAG CAG ATC GAG AG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amplifizierung von Thioredoxin, Einführung einer XhoI-Schnittstelle ▪ Nachweis von Thioredoxin in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden 	59°C
Thioredoxin rev (3'-Primer)	TCC GGA TCC TTA GAC TAA TTC ATT AAT GGT GG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amplifizierung von Thioredoxin, Einführung einer BamHI-Schnittstelle ▪ Nachweis von Thioredoxin in RT-PCR ▪ Herstellung markierter Sonden 	59°C

2.7 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten	Bio-Rad (München)
Filme	Ferrania (Italien)
Filter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filterpapier 3 MM Whatman	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Plastikware für Zellkultur	TPP (Schweiz)
Roti-Nylon-Plus-Membran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Sterilfilter Top Bottle Filter	Nalgene Nunc International (USA)

2.8 Geräte

Allegra 21 Zentrifuge	Beckman (Krefeld)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Mannheim)
Bodenzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Mannheim)
Crosslinker	Stratagene (La Jolla, USA)
Elektrophorese-Zubehör	Bio-Rad (München)
FACS EPICS XL	Beckman, Coulter (USA)

Material

Feinwaage Voyager 50228	Ohaus (Giessen)
Fluoreszenz Mikroskop	Olympus (Hamburg) Zeiss (Jena)
Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad (München)
Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
horizontaler Gelträger Agarosegele	Bio-Rad (München)
Hybridisierungssofen Hybaid	MWG-Biotech (Ebersberg)
IEF-Zellen	Bio-Rad (München)
Imaging System 440	Kodak (USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Mannheim)
Lasermikroskop LSM 510 META NLO	Carl Zeiss (Jena)
LCQ Deca Xplus	Thermo Electron (San José, USA)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Microplattenreader MR 7000	Dynatech (Denkendorf)
Mikroskop CK30	Olympus (Hamburg)
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus (Mannheim)
PCR-Maschine DNA Engine PTC-200	Biozym (Oldendorf)
PDQuest 2D-Gel-Analysesoftware	Bio-Rad (München)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Power-Pac 200	Bio-Rad (München)
Reinstwasseranlage	PureLab ultra Labtech (Wohlen)
Rotamix Überkopf-Schüttler	ELMI (Latvia)
Schüttler Vibrax	IKA Labortechnik (Staufen)
Shaker S4	ELMI (Latvia)
Blottingkammer PHERO-Multi	Biotec-Fischer (Reisfelden)
Spektrophotometer DU 640	Beckman (Krefeld)
Thermomixer compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Mannheim)
UV-Transilluminator	Stratagene (Amsterdam)
Viktor2 Multilabel Counter	Wallac (Finnland)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage Voyager 50187	Ohaus (Giessen)

Wasserbad	Gsf. f. Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifuge J2 MC Rotor JA-14	Beckman (Krefeld)

2.9 Kits und gebrauchsfertiges Material

2-D Quant-Kit	Amersham (Freiburg)
BCA-Kit	Pierce (Bonn)
ExGen 500	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	PEQLAB (Erlangen)
GST-Sepharose	Amersham (Freiburg)
M2-FLAG beads	Sigma (St. Louis, USA)
Megaprime	Amersham (Freiburg)
Nucleobond AX 2000 Kit	Macherey-Nagel (Düren)
ReadyStrip™IPG-Streifen	Bio-Rad (München)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Sephadex™G-50-Säulchen	Amersham (Freiburg)
TNT <i>in vitro</i> Translationssystem	Promega (Mannheim)
Trizol ^R	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

3. Methoden

Der Methodenteil ist in 3 Abschnitte gegliedert: im ersten sind Rezepte für gebräuchliche Lösungen und Puffer aufgeführt, im zweiten sind alltägliche Methoden der Molekular- und Zellbiologie sowie der Biochemie allgemein beschrieben, im letzten Teil wird im Detail darauf eingegangen, wie genau in der Arbeit vorgegangen wurde. Der erste und zweite Teil sollen als Nachschlagewerk für gängige Labormethoden dienen, der dritte umfasst Informationen, die für das Verständnis der Resultate wichtig sind.

3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Aktivkohle-DextranT70 Mischung: 50 g Aktivkohle + 500 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 min langsam rühren, Kohle absetzen lassen, Überstand verwerfen und Vorgang wiederholen; 5 g Dextran T70 + 400 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0 zugeben, autoklavieren.

Antibiotika:

Ampicillin-Stocklösung 50 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml

Kanamycin-Stocklösung 50 mg/ml, Endkonzentration: 50 µg/ml

DEPC-H₂O: 2 l H₂O + 2 ml DEPC über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren.

LB-Agarplatten: 20 g LB Broth-Base, 15 g Agar-Agar in 1 Liter ddH₂O lösen und autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit Antibiotikum versetzen und in 10 cm-Platten giessen.

Steroid-freies FBS: 500 ml FBS 30 min bei 50°C hitzeinaktivieren, mit 25 g AG1-X8 Resin über Nacht bei 4°C langsam rühren, FBS dekantieren, mit 10 ml Aktivkohle-Dextran Mischung über Nacht rühren, 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren, durch Faltenfilter filtrieren, steril filtrieren.

TB-Medium: 12 g Trypton, 24 g Hefe Extrakt, 4 ml Glycerin in 900 ml H₂O lösen und autoklavieren; 2,3 g KH₂PO₄, 12,5 g K₂HPO₄ in 100 ml H₂O lösen und autoklavieren; kurz vor Gebrauch beide Lösungen mischen.

10x TBS: 1,5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0

TBST: 1x TBS, 0,05% Tween

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Trypsin: 100 ml Trypsin-EDTA + 100 ml 10x EBSS + 800 ml steriles H₂O, steril filtrieren.

3.2 Protokolle für Standardmethoden

3.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

3.2.1.1 Bakterienkultur

Kultivierung und Lagerung von Escherichia coli (E.coli)

Der gewünschte Bakterienstamm wurde von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder direkt aus der Glyzerinkultur in sterilem TB-Medium, welches mit dem Selektionsantibiotikum versetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Herstellung von Glyzerinkulturen wurden 1 ml der Übernachtskultur bei 3500 rpm 4 min abzentrifugiert und in 200 µl TB-Medium + 50% Glycerin resuspendiert. Die Glyzerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

Herstellung kompetenter Bakterien

Lösungen:

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

TFB2: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 6,8 mit KOH einstellen, steril filtrieren

E.coli DH5α Bakterien wurden einmal kommerziell erworben und anschliessend selbst weitergezogen sowie kompetent gemacht. Die Bakterien wurden in 10 ml TB-Medium ohne Antibiotikum bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in 150 ml TB-Medium überführt und so lange weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war (sollte nicht überschritten werden). Alle folgenden Schritte wurden mit vorgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt. Die

Bakterienkultur wurde auf Zentrifugiergefäße verteilt und 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm und 4°C wurden die sedimentierten Bakterien in 45 ml TFB1–Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension 90 min auf Eis inkubiert, wie oben zentrifugiert und das Pellet in 6 ml TFB2 aufgenommen. Die Bakterien wurden sofort in einem Trockeneis-Ethanol-Bad eingefroren und aliquotiert bei -80°C gelagert.

Transformation

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz wurden mit 50 µl der Bakteriensuspension gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s gefolgt von erneuter Inkubation auf Eis für 2 min. Der Transformationsansatz wurde mit 450 µl SOC-Medium versetzt, 1 h bei 37°C inkubiert und damit eine Übernachtskultur angeimpft oder auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten Einzelkolonien von den Platten gepickt werden.

3.2.1.2 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

Minipräparation mit E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit

Diese Art von Aufreinigung wurde für die Analyse von Einzelkolonien verwendet, die nach Transformation eines Ligationsansatzes auf Agarplatten gewachsen waren. Die Präparation mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit von Peqlab beruht auf dem Prinzip, dass DNA selektiv und reversibel in Abhängigkeit von der Ionenstärke an Silicagel-Membranen bindet. Die Membran befindet sich in Zentrifugationssäulchen, auf die das Zellysate gegeben wird. Die DNA bindet unter Hochsalzbedingungen, so dass nach Waschschritten mit Wasser eluiert werden kann. Die Bakterien werden unter alkalischen Bedingungen lysiert, wobei die DNA denaturiert und RNA zerstört wird. Nach Neutralisierung der Lösung fällt die chromosomale DNA und Zelltrümmer aus, die dann abzentrifugiert werden können, die Plasmid-DNA bleibt hingegen in Lösung. Das detaillierte Protokoll und die Pufferrezepte sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

Maxipräparation mit Nucleobond AX Kit

Für die Herstellung grosser DNA-Mengen mit hohem Reinheitsgrad (wichtig z.B. für die Anwendungen in der Zellkultur) wurde der Nuceobond AX Kit von Macherey-

Nagel verwendet. Die Zellyse erfolgt wie für die Minipräparation, das Aufreinigungsverfahren ist jedoch ein anderes. Die DNA wird in diesem Fall an eine Anionen-Austausch-Säule gebunden, nach einem Waschschrift mit Hochsalz-Puffer eluiert und mittels Isopropanol gefällt. Das Protokoll und die Pufferrezepte sind im Handbuch des Herstellers beschrieben.

Präparation von RNA

Für die Präparation von RNA wurde entweder Trizol^R von Invitrogen oder der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Trizol^R ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Die Zellen werden darin direkt lysiert, wobei die RNA intakt bleibt. Zugabe von Chloroform führt zur Bildung einer organischen und einer wässrigen Phase, wobei sich die RNA in der wässrigen befindet, aus der sie mit Isopropanol gefällt werden kann. Das detaillierte Protokoll ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen. Die Präparation mit dem RNeasy Kit erfolgt über Zentrifugiersäulchen, die eine Silicagel-Membran enthalten. Wie DNA bindet RNA unter Hochsalzbedingungen an diese Membran und kann dann mit Wasser eluiert werden. Das genaue Protokoll ist im Handbuch des Herstellers beschrieben.

Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient der Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen. DNA in einem Minimalvolumen von 100 µl wurde mit einem Volumen Phenol (Phenol, mit TE-Puffer, pH 7,0 äquilibriert und mit 0,1% 8-Hydroxychinolin versetzt) gemischt und kurz zentrifugiert. Anschliessend wurde ein Volumen Chloroform (Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1) zugegeben und kräftig gevortext. Um eine schnellere Phasentrennung zu erreichen wurde 3 min bei 13'000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäss überführt und die oben beschriebene Prozedur wiederholt. Anschliessend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Ethanol-fällung

Zur Aufreinigung nach der Phenolextraktion, Beendigung enzymatischer Reaktionen oder zur Konzentrierung von DNA oder RNA wurden Ethanol-Fällungen durchgeführt. Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 3,5, gemischt, dann mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und erneut gut gemischt. Die Nukleinsäure wurde 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt.

Der Ansatz wurde bei 13'000 rpm / 4°C zentrifugiert, das Pellet einmal mit 70% EtOH gewaschen und danach luftgetrocknet. Die Nukleinsäure wurde in TE-Puffer oder Wasser gelöst. Für die Fällung von RNA wurden alle Lösungen mit DEPC-Wasser hergestellt.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Lösungen weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion auf, die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der Konzentration proportional ist. Eine DNA-Lösung der Konzentration 50 µg/ml hat bei 260 nm Wellenlänge eine OD von 1, RNA hat bei OD 1 eine Konzentration von 40 µg/ml, wenn der Durchmesser der Küvette 1 cm beträgt. Die Konzentration von Nukleinsäuren konnte also photometrisch durch Messung der Extinktion (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1 cm dicken Quarz-Küvette bestimmt werden. Die zu messende Lösung wurde so verdünnt, dass im linearen Bereich zwischen $A = 0,1$ und $1,0$ gemessen werden konnte. Zusätzlich wurde auch die Extinktion bei 280 nm bestimmt; der Quotient A_{260}/A_{280} gibt Informationen zu möglichen Proteinkontaminationen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.1.3 Bearbeitung von DNA

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Hierfür benötigt man zwei Oligonucleotide, die die gewünschte Sequenz flankieren und spezifisch an die DNA binden. Die Amplifizierung erfolgte mit einer thermostabilen Pwo-Polymerase, wenn das Fragment für eine Klonierung verwendet wurde, da sie eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität und damit eine 10x niedrigere Fehlerrate als die Taq-Polymerase aufweist. Letztere wurde für RT-PCRs verwendet, bei der das Produkt nicht fehlerfrei sein musste. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt:

5 µl	10x Reaktionspuffer mit 20 mM MgSO ₄
10 pmol	von jedem Primer
200 µM	dNTPs
10-50 ng	DNA-Templat
1-2,5 U	Polymerase

Die PCR wurde nach folgendem Zyklusprofil über 24-35 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung	30 s, 94°C
Annealing	30 s, 40-65°C (Primer-abhängig, 2°C für A/T + 4°C für G/C)
Elongation	30-90 s, 72°C (30 s/500 bp)

10 µl des PCR-Ansatzes wurden jeweils zur Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert, aus dem Rest wurde die DNA vor der Weiterverarbeitung mit Ethanol gefällt.

DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben der Hersteller im empfohlenen Reaktionspuffer und BSA nach Bedarf. Wurde mit mehreren Enzymen geschnitten, deren Pufferbedingungen nicht übereinstimmten, wurde die DNA nach der ersten Spaltung mit Ethanol gefällt und dann mit dem zweiten Enzym geschnitten. 1-10 µg DNA wurden mit 2-5 Einheiten Enzym in einem Endvolumen von 20-50 µl für 2h bei 37°C inkubiert, anschliessend wurde die Effizienz der Spaltung auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

Auffüllen von 3'-überhängenden Enden

Um bei DNA-Fragmenten das 3'-überhängende Ende aufzufüllen, wurde nach der Restriktionsspaltung eine Behandlung mit Pwo-Polymerase durchgeführt. Hierzu wurde das gefällte Fragment in 50 µl PCR-Ansatz ohne Primer 10 min bei 72°C inkubiert. Dadurch entsteht ein glattes (blunt) 3'-Ende. Das DNA-Fragment wurde anschliessend mit Ethanol gefällt.

Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden

Linearisierte Klonierungsvektoren wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt, um die Religation des Vektors zu unterbinden. Alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphats von DNA. 1 µl CIP wurde dem Restriktionsverdau-Ansatz 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit zugegeben, danach wurde die DNA über ein Agarosegel von den Enzymen und den herausgespaltenen Fragmenten abgetrennt und gereinigt.

Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Um ungeschnittene Fragmente ligierbar zu machen oder DNA radioaktiv zu markieren, wurde 3'-phosphatasefreie T4 Polynucleotid-Kinase (PNK) verwendet.

Dieses Enzym katalysiert den Transfer der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe der DNA. 20 pmol 5'-OH-Enden wurden mit 20 pmol ATP oder ^{32}P - γ -ATP mit Phosphorylierungspuffer in einem Endvolumen von 50 μl gemischt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und durch rasches Abkühlen auf Eis gestoppt.

Native Agarosegele

Native Agarosegele dienen der Kontrolle von Plasmiden, Restriktionsspaltungen oder PCR-Reaktionen.

Lösungen:

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

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

Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol

1-2% Agarose wurde in 1x TBE-Puffer suspendiert und durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Die Gellösung wurde in einen horizontalen Gelträger, der mit einem Kamm versehen war, gegossen und erstarren lassen. In dieser Zeit wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und der gewünschte DNA-Marker 4 min bei 65°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer, versetzt mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ml), bei einer Spannung von 100-200 V für 30-60 min. Die DNA konnte auf einem UV-Transilluminator analysiert und fotografiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der Gelelektrophorese konnte die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Bestrahlungszeit so kurz wie möglich war, um UV-Schäden der DNA zu vermeiden. Die Isolierung der DNA aus dem Gel wurde mit dem QIAquick oder QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen durchgeführt. Beide Methoden beruhen auf der Bindung von DNA an Silicagel, nachdem die Agarose geschmolzen wurde. QIAquick verwendet Silicagel-Membranen in Zentrifugationssäulchen, QIAEX II Silicagel-Partikel, die beim Schmelzen der Agarose beigefügt werden. Die Bindung an Silicagel-Matrizen erfolgt unter Hochsalzbedingungen, die DNA kann dann mit Wasser oder TE-Puffer eluiert werden. Protokolle und die Zusammensetzung der Pufferlösungen sind den entsprechenden Handbüchern des Herstellers zu entnehmen.

Ligation von DNA

Bei der Ligation eines Vektors mit einem Insert wird durch die T4-DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH- mit einer 5'-Phosphatgruppe durch die Ausbildung einer Phosphatdiesterbindung kovalent verknüpft. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert wurde zwischen 1:2 und 1:5 gewählt, je nach Qualität der Fragmente. Die zu ligierenden Fragmente wurden mit 10 U T4-Ligase und Ligationspuffer in einem Volumen von 20 µl gemischt. Der Ansatz wurde 16 h bei 16°C und anschliessend 4 h bei 4°C inkubiert.

Markierung von DNA-Sonden durch „random priming“

Beim „random priming“ wird lineare DNA produziert, in deren Sequenz markierte Nucleotide eingebaut werden. Die DNA wird dafür denaturiert, so dass kurze Primer aus einem randomisierten Gemisch zufallsverteilt binden können. Der DNA-Primer-Komplex ist ein Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, die mit markierten und unmarkierten dNTPs neue Stränge produziert. Das Klenow-Fragment enthält keine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität, so dass eingebaute markierte Nucleotide nicht wieder entfernt werden. Zur Markierung der Sonden wurde [α -³²P]dCTP und der Megaprime Kit der Firma Amersham verwendet. Das detaillierte Protokoll ist im Handbuch des Herstellers beschrieben. Nach dem „random priming“ mussten die nicht-inkorporierten markierten Nucleotide entfernt werden. Dafür wurden SephadexTMG-50-Säulchen verwendet. SephadexTMG-50 ist eine Gelfiltrationsmatrix, die einzelne Nucleotide bindet, während Oligonucleotide ungehindert passieren können. Der Reaktionsansatz wurde auf die Säule gegeben und 5 Fraktionen à 400 µl in TE-Puffer gesammelt. Die am höchsten radioaktive Fraktion (Nr. 3) enthielt die DNA-Sonde. Diese wurde mit Ethanol gefällt und in 150 µl 0,1% SDS aufgenommen. Bei der Ethanolfällung wurde Heringsspermien-DNA als „Carrier“ zugegeben; „Carrier“ erhöhen die Effizienz der Fällung und werden immer dann verwendet, wenn sehr wenig DNA vorhanden ist.

3.2.1.4 Bearbeitung von RNA

Generell muss beim Arbeiten mit RNA darauf geachtet werden, dass alle Geräte und Reagenzien RNase-frei sind. Arbeitsplatz und Geräte wurden daher vor dem Experiment immer mit „RNASE FREE“, einem Detergenz das RNase zerstört,

behandelt; Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-Wasser hergestellt und wenn möglich autoklaviert.

Reverse Transkription

Reverse Transkriptase (RT) ist ein virales Enzym, das RNA in DNA umschreibt. Damit ist es möglich, von der mRNA einer Zelle ausgehend cDNA herzustellen, die dann wiederum mittels PCR amplifiziert werden kann. Der Primer für die RT bindet an die Poly-A-Schwänze von mRNA, so dass nur mRNA und keine andere RNA transkribiert wird. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg präparierte RNA (Abschnitt 3.2.1.2) eingesetzt. Die RNA wurde 10 min bei 65°C denaturiert und danach sofort auf Eis gebracht. Die Reaktion fand in einem totalen Volumen von 20 µl statt und bestand aus folgenden Lösungen:

2 µl	RT-Puffer
200 µM	dNTPs
100 pmol	Oligo-dT-Primer
4 U	Rnasin (RNase-Inhibitor)
200 U	RT
1 µg	hitzedenaturierte RNA

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die entstandene cDNA konnte dann in einer PCR eingesetzt (Abschnitt 3.2.1.3) oder bei –20°C gelagert werden.

Denaturierende Agarosegele

Mit diese Art der Agarosegelelektrophorese wird RNA aufgetrennt, die im Anschluss mittels Northernblot analysiert werden soll.

Lösungen:

5x MOPS: 20,6 g MOPS, 3,28 g Natriumacetat in 800 ml DEPC-H₂O lösen, pH 7,0 einstellen; 10 ml 0.5 M EDTA, pH 8,0 zugeben, auf 1 l auffüllen; sterilfiltrieren
0,6 g Agarose wurde in 40 ml DEPC-H₂O durch kochen in der Mikrowelle gelöst, danach wurden unter dem Abzug 12,3 ml 5x MOPS und 11,1 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel in einem horizontalen Gelträger gegossen, der mit einem Kamm versehen war. Für die Proben wurden 10-20 µg Gesamt-RNA (Abschnitt 3.2.1.2) mit 1 µl Ethidiumbromid und 12 µl Probenpuffer (14,2 µl 5x MOPS, 24,8 µl Formaldehyd, 71 µl Formamid) 15 min bei 65°C inkubiert. Anschliessend wurde 2 µl DNA-Auftragspuffer (s. native Agarosegele) zugegeben und die Proben bis zum

Auftragen auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 100 V für 60-90 min.

Northernblot-Analyse

Für einen Northernblot wird RNA von einem denaturierenden Agarosegel auf eine Membran transferiert. Diese wird dann mit markierten Sonden inkubiert, die mit einer bestimmten mRNA hybridisieren kann. Dadurch ist es möglich, die Transkriptionsrate einzelner Gene zu vergleichen.

Lösungen:

20x SSC: 175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat auf 1 l DEPC-H₂O, pH 7,0 einstellen, autoklavieren

20x SSPE: 175,3 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄, 7,4 g EDTA auf 1 l DEPC-H₂O, pH 7,4 einstellen, autoklavieren

Die RNA wurde durch Kapillardiffusion auf eine Roti-Nylon-Plus Membran transferiert. Dafür wurde ein Filterpapier beidseitig in 20x SSC-Puffer eingetaucht, darauf das Agarosegel mit der aufgetrennten RNA (Taschenöffnungen nach unten) platziert, die Membran auf das Gel und darauf zwei Filterpapiere gelegt. Ganz oben wurde ein Stapel Papiertücher und eine Glasplatte als Gewicht platziert. Der Transfer dauerte 2 Tage. Danach wurde die RNA durch „cross-linking“ an die Membran gebunden, indem die Membran für 30 s einer UV-Strahlung von 120 mJ ausgesetzt wurde. Für die Hybridisierung wurden ³²P-markierte DNA-Sonden verwendet (Abschnitt 3.2.1.3). Die Membran wurde in Hybridisierungsflaschen mit 10 ml RapidHyb-Puffer bei der Hybridisierungstemperatur (55-65°C) für 20 min prähybridisiert, danach wurde die Sonde zugegeben (die Hälfte der Reaktion aus Abschnitt 3.2.1.3). Nach zweistündiger Hybridisierung folgten verschiedene Waschschrte mit 2x, 1x und 0,5x SSPE/0,1% SDS, wobei die Länge der einzelnen Waschschrte von der Stärke der Sondenbindung und der unspezifischen Bindung abhing. Die Membran wurde über Nacht auf einen Film exponiert.

3.2.2 Standardmethoden der Zellbiologie

3.2.2.1 Zellkultur

Vermehrung

Alle verwendeten Zelllinien wurden als adhärenente Zellen in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% FBS, 1% Antibiotikum-Lösung und

1% Pyruvat. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten, mussten sie ausgedünnt werden. Das Ausdünnen der Zellen variierte je nach Zelltyp von 1:2 (SK-N-MC) bis 1:10 (HEK293). Zum Ausdünnen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin pro 75 cm²-Flasche versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einem sterilen Falcontube bei 1000 rpm 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Verdünnungsfaktor in frischem Medium suspendiert und in neue Flaschen verteilt.

Lagerung

Zellen können bei –190°C dauerhaft gelagert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten Flasche pelletiert, in 700 µl FBS resuspendiert und in ein Cryoröhrchen überführt, in dem 700 µl FBS + 10% DMSO vorgelegt waren. Der Einfrierprozess sollte langsam vor sich gehen, um spätere Schäden durch starke Kristallbildung zu vermeiden. Die Cryoröhrchen wurden deshalb erst bei –80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, musste das im Einfriermedium enthaltene DMSO, welches zytotoxisch wirkt, entfernt werden. Dazu wurden die Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und möglichst schnell aufgetaut. Anschliessend wurden die Zellen in ein Falconröhrchen mit vorgelegtem Medium überführt und 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind prokaryotische Mikroorganismen ohne Zellwand und stellen eine der häufigsten Kontaminationen von Zellkulturen dar. Da Mycoplasmen den Stoffwechsel, die Morphologie und die Proliferation von Zellen beeinflussen und damit die Ergebnisse von Experimenten verändern können, sind regelmässige Mycoplasmentests nötig. Der Nachweis erfolgte durch Anfärben der Doppelstrang-DNA mit dem Farbstoff Bisbenzimid und anschliessender Untersuchung der Fluoreszenz im Mikroskop. Die Zellen wurden dafür auf 100 mm Kulturplatten bis zu einer Dichte von 60-80% herangezogen und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml 1 µg/ml Bisbenzimid in Methanol gewaschen, danach mit einem

neuen 5 ml Aliquot 15 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde der Farbstoff abgesaugt und das Methanol verdunstet. Die Fluoreszenz konnte nun mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit Inversionsobjektiv sichtbar gemacht werden. Eine mit Mycoplasmen infizierte Kultur erkennt man daran, dass neben der klar abgegrenzten Kernfluoreszenz der Zellen auch das Cytoplasma bzw. äussere Bereiche gefärbt sind.

3.2.2.2 MTT-Assays

MTT ist ein Farbstoff, der während der Zellteilung in die DNA eingebaut wird. Er kann verwendet werden, um das Wachstum von Zellen colorimetrisch zu messen. Je mehr MTT eingebaut wird, das heisst je höher die Absorption des Farbstoffes in der Lösung ist, desto grösser ist das Zellwachstum.

Puffer:

MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT in PBS

Solubilisierungspuffer: 5% SDS, 50% Dimethylformamid, pH 4,1 mit Essigsäure einstellen

Zellen wurden in 96-Lochplatten ausgesät, wobei die ersten 3 Löcher freigelassen wurden. Nach Behandlung der Zellen wurden sie 3-8 h mit 10 µl MTT-Lösung pro Loch bei 37°C inkubiert, bis eine Blaufärbung zu sehen war. Danach wurden in jedes Loch 10 µl Solubilisierungspuffer gegeben und die Platten über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 630 nm gemessen.

3.2.2.3 Transfektionen

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingeschleust. Die Zellen können mit verschiedenen Methoden zur Aufnahme der DNA gebracht werden. Im folgenden sind die für die Arbeit verwendeten Methoden beschrieben.

Transfektion durch ExGen 500

Das kationische Polymer "ExGen 500" (Fermentas) ist ein lineares Polyethylenimin-Derivat mit einem molekularen Gewicht von 22 kDa und hat eine hohe kationische Ladungsdichte. Es bildet mit der DNA durch ionische Wechselwirkungen Komplexe aus, die sich an der Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose aufgenommen werden. ExGen 500 ist ein effizientes Transfektionsreagenz, aber sehr teuer, so dass diese Methode nur für ausgewählte Transfektionen verwendet wurde. Die

Transfektion fand in 6-Lochplatten statt. Das detaillierte Vorgehen ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

Elektroporation

Bei der Elektroporation nutzt man den Effekt, dass elektrische Impulse die Durchlässigkeit von Biomembranen erhöhen ohne die Membranstruktur nachhaltig zu zerstören. Durch vorübergehend gebildete Löcher können Partikel wie DNA ins Cytoplasma gelangen.

Lösungen:

Magnesiumsulfat-Puffer: 1 M MgSO₄, pH 6,7, autoklavieren

Elektroporationspuffer: 50 mM K₂HPO₄, 20 mM Kaliumacetat, pH 7,35 mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren

Pro Reaktionsansatz wurden die Zellen von einer bzw. für HeLa-Zellen von zwei dichten 100 mm Kulturschalen pelletiert, das Zellpellet in 390 µl Elektroporationspuffer und 10 µl Magnesiumsulfat-Puffer resuspendiert und die gewünschten Plasmide zugegeben. 400 µl des Reaktionsansatzes wurde in eine Elektroporationsküvette pipettiert und elektroporiert. Die optimalen Elektroporationsbedingungen wurden im Vorfeld für jede Zelllinie ermittelt (Sk-N-MC: 300 V; 600 µF, HeLa und HEK293: 350 V; 700 µF). Nach der Elektroporation wurden je 150 µl der Zellsuspension in zwei 60 mm Kulturschalen oder der gesamte Ansatz in eine 100 mm Schale überführt und dem Medium je nach Aufbau des Experiments Hormon oder Vehikel beigefügt.

3.2.2.4 Reporter-Gen-Assays

Luciferase-Assays

Zur Messung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren können Reporter-Gen-Assays verwendet werden. Dabei wird die Expression von sogenannten Reporter-Genen gemessen, die von Promotoren mit artifiziellen oder natürlichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor getrieben werden. Die Transkriptionsrate des Reporters wird umso höher, je aktiver der Transkriptionsfaktor ist. Die Glühwürmchen-Luciferase ist ein sehr sensibles Reporter-Gen. Sie katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht. Unter Substratsättigung ist die Enzymaktivität proportional zur gebildeten Enzymmenge und somit zur Aktivität des Transkriptionsfaktors.

Lösungen:

0,5 M Kaliumphosphatlösung: 400 ml 0,5 M K_2HPO_4 mit 0,5 M KH_2PO_4 auf pH 7,8 einstellen

Luciferase-Lysispuffer: 1 mM DTT, 0,1 M Kaliumphosphatlösung

ATP-Lösung: 0,1 M ATP in H_2O , pH 7,0

Luciferin-Lösung: 10 mg Luciferin in 1 ml Methanol lösen, 400 μ l 0,5 M Kaliumphosphatlösung und 1,6 ml H_2O zugeben

Die Zellen wurden in 150-500 μ l Luciferase-Lysispuffer durch 3maliges Schockfrieren im Trockeneis-Ethanolbad und Auftauen lysiert und danach 4 min bei 13'000 rpm abzentrifugiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte in Mikrotiterplatten durch ein Luminometer Victor2 von Wallac mit automatischer Injektion von 150 μ l der Luciferinlösung. Da das Gerät einen Vorlauf von 8 Proben hat, um das Pipettiersystem mit Substratlösung zu füllen, mussten die ersten 8 Löcher der Platte freigelassen werden und die Reaktionslösung für 8 zusätzliche Proben nach folgendem Schema pro Probe gemischt werden:

10 μ l Kaliumphosphatlösung

2,5 μ l 0,1 M ATP

5 μ l 0,1 M $MgCl_2$

2 μ l 10 mM Luciferin

130,5 μ l H_2O

=150 μ l pro Probe.

50 μ l der Proben wurden in der Mikrotiterplatte vorgelegt und nach der Injektion der Substratlösung für 10 s gemessen. Der Messwert wird in RLU (engl.: relative light units) angegeben.

β -Galaktosidase-Messung

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde mit dem Reporter gen ein Kontrollplasmid cotransfiziert, welches nicht von der Aktivität des Rezeptors abhängt. Hierfür wurde β -Galaktosidase getrieben vom CMV-Promotor verwendet. Die Aktivität der β -Galaktosidase kann gemessen werden, indem O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), ein synthetisches Substrat der β -Galactosidase, in die Reaktionslösung gegeben wird. ONPG (farblos) wird vom Enzym in O-Nitrophenol umgewandelt, das gelb ist und somit colorimetrisch gemessen werden kann.

Lösungen:

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

ONPG-Lösung: 2 mg/ml O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid in H_2O

50 μl des Zelllysats für die Luciferase Messung wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, in die bereits 100 μl β -Galactosidase-Puffer vorgelegt worden waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl ONPG-Lösung gestartet und für 10-30 min bei 37°C inkubiert, bis eine Gelbfärbung eingetreten war. Die Extinktion wurde in einem Multiphotometer bei 405 nm gemessen.

Auswertung der Daten

Für die Auswertung wurde von den gemessenen Luciferasewerten der Gerätehintergrund abgezogen und dieser Wert dann auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt, aus denen nach der Normalisierung der Mittelwert gebildet wurde.

3.2.2.5 Fluoreszenzanalyse

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann die Lokalisation von Proteinen in der Zelle sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde dazu das Protein von Interesse mit GFP (green fluorescence protein) gekoppelt, so dass nicht mit Fluorophor-fusionierten Antikörpern gearbeitet werden musste.

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 6 Lochplatte so ausgesät, dass sich ca. 2×10^5 Zellen in jedem Loch befanden. Damit die Zellen besser adhäreren, wurden die Deckgläschen erst mit 0.1% Gelatine beschichtet. Die Zellen wurden in steroidfreiem Medium ohne Phenolrot gehalten und einen Tag nach dem Aussäen mit ExGen transfiziert (Abschnitt 3.2.2.3). 24 h nach der Transfektion konnten die Zellen je nach Versuchsaufbau für unterschiedliche Zeiträume mit Hormon behandelt werden, danach wurden sie mit 4% PFA in PBS für 15 min fixiert und 2x mit TBST gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten mit ProTaq Mount Fluor-Einbettmedium auf Objekträger fixiert und die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 405 nm ausgewertet.

3.2.3 Standardmethoden der Proteinbiochemie

3.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration in einer Lösung kann durch diverse Methoden erfolgen. Einerseits kann sie durch Messung der Absorption einer Protein-Lösung berechnet werden, andererseits kann sie durch eine Farbreaktion und anschließende photometrische Messung der Farbintensität bestimmt werden. Die Farbintensität wird mit einer Standardkurve verglichen, für die Lösungen mit bekannter Proteinmenge gemessen werden. Der Nachteil der Absorptionsbestimmung ist, dass die Proteinlösung keine Reagenzien enthalten darf, die bei 280 nm absorbieren; der Nachteil der Farbreaktionen hingegen ist, dass die Reaktionen nicht kompatibel sind mit diversen Chemikalien und Detergenzien, die oft in Puffern zu finden sind. Deswegen wurde für jede Konzentrationsbestimmung die bestmögliche Methode gewählt. Im folgenden sind die drei in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben.

Absorptionsmessung

Diese Methode basiert auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Störung durch Nukleotide oder Nukleinsäuren kann durch Messung der Extinktion bei 260 nm eliminiert werden. Zur Errechnung der Proteinkonzentration wurde die Formel von Warburg und Christian verwendet:

$$c = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} \text{ (mg/ml)}.$$

BCA-Kit

In den meisten Fällen wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration der BCA-Kit von Pierce verwendet. Das Reaktionsschema kombiniert die Biuret-Reaktion (Protein+Cu²⁺ in alkalischer Lösung führt zur Bildung von Cu⁺) mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA), einem sehr spezifischen Nachweisreagenz für Cu⁺. Durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu⁺-Ion entsteht ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung. Die Messung erfolgte auf einer Mikrotiterplatte in einem Mikroplattenreader nach Angaben des Herstellers.

2-D Quant-Kit

Diese Methode wurde für Proben verwendet, die in der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Der Puffer für die isoelektrische Fokussierung enthält grosse Mengen an Harnstoff und Thioharnstoff, die nicht mit der BCA-Reaktion kompatibel sind. Das Prinzip des 2-D Quant-Kits von Amersham beruht auf der quantitativen Präzipitierung der Proteine. Das Präzipitat wird in einer Lösung resuspendiert, die Kupferionen enthält, welche an die Proteine binden. Gemessen wird die Menge an gebundenen Kupferionen durch Zugabe eines colorimetrischen Reagenz, dessen Absorption umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration ist. Das genaue Vorgehen ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3.2.3.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mittels SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. SDS lagert sich an Proteine an, und die Menge der angelagerten Moleküle ist proportional zur Grösse des Proteins. SDS ist stark negativ geladen, so dass die Auftrennung im elektrischen Feld nur durch die angelagerten SDS-Moleküle bestimmt wird, die Ladungen der Aminosäuren sind vernachlässigbar. Die Polyacrylamid-Gele unterteilen sich in ein oberes Sammelgel und ein darunter liegendes Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert unterscheiden. Aufgrund des unterschiedlichen pHs der Gele ändert sich das Ionenverhältnis von Sammelgel zu Trenngel, so dass die zu trennenden Proteine im Sammelgel schneller laufen können als im Trenngel. Dadurch werden sie beim Übergang der beiden Gele zu einer scharfen Lauffront konzentriert, um anschliessend gemeinsam in das höher vernetzte Trenngel einzutreten, wo sie nach ihrer Grösse getrennt werden.

Lösungen:

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

2x Sammelgel-Puffer: 0,2% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 6,8

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

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

Die Gele wurden zwischen 2 abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten, die durch 1 mm breite „Spacer“ getrennt waren, gegossen. Das Trenngel (10-15%, vgl. **Tabelle 3.1**) wurde sofort mit Isopropanol überschichtet, wodurch eine gerade,

waagerechte Trenngelkante gewährleistet wurde. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel darauf gegossen. Hier wurde zur Bildung der Probestaschen ein Kamm eingeführt.

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	15%	4%
Acrylamid-Bis (ml)	3,75	5	10	0,338
ddH ₂ O (ml)	2,5	5	10	0,9
3xTrenngelpuffer (ml)	2,5	5	10	-
2x Sammelgelpuffer (ml)	-			1,25
10% APS (µl)	25	50	100	12,5
TEMED (µl)	6,25	12,5	25	2,5

Tabelle 3.1: Eingesetzte Lösungen für 1 Trenn- bzw. Sammelgel.

Die Proteinproben (20-40 µg Gesamtprotein) wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und 4 min bei 95°C denaturiert. Das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert dabei die Disulfidbrücken. Die Proteine wurden in einer vertikalen Apparatur bei 140 V 60-100 min in 1x Laemmli-Laufpuffer aufgetrennt. Anschliessend konnten die Proteine entweder mit Coomassie-Blue angefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert werden.

3.2.3.3 2D-Gelelektrophorese

Die Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF) in der 1. Dimension der Auftrennung und durch SDS-PAGE in der 2. ist eine wirksame Methode dar, komplexe Proteingemische zu untersuchen. Bei der IEF werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einer Gelmatrix aufgetrennt, in die ein pH-Gradient eingebaut ist. Danach werden die Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrer Grösse aufgetrennt. Die entstandenen Gele können dann mit Coomassie angefärbt werden, um möglichst viele Proteine zu visualisieren, oder es können bestimmte Proteine mittels Westernblot-Analyse untersucht werden. Für die IEF wurden vorgefertigte Gel-Streifen von BioRad verwendet, die aus Acrylamid bestehen, in das puffernde Acrylamidderivate mit freien Carboxy- oder tertiären Amin-Gruppen (Ampholyte) so eingelagert sind, dass der pH-Gradient entsteht.

Lösungen:

Urea-Thiourea-Puffer: 2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 2% CHAPS, 0,2% Biolyte 3-10, 100 mM DTT, Bromphenolblau

Äquilibriumspuffer: 6 M Harnstoff, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 2% SDS, 20% Glycerin

10x TGS: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Für jedes Gel wurden 5×10^7 Zellen in Urea-Thiourea-Puffer (komplementiert mit dem Proteaseinhibitor-Cocktail Complete (1:25), 1 mM PMSF und 1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin) während 1 h auf Eis lysiert und danach bei 13'000 rpm und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Durch diese Behandlung wurde auch die Kernmembran aufgeschlossen, das heisst die Lysate enthielten sowohl cytoplasmatische wie auch nukleäre Proteine. Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mit dem Amersham 2-D Quant Kit bestimmt. 300 μl Zelllysat (200-300 μg Gesamtprotein) wurde auf einen ReadyStrip™IPG-Streifen von 17 cm Länge nach Anleitung des Herstellers geladen und mit Mineralöl überschichtet. Der Streifen wurde bei 50 V für 12 h aktiv rehydriert. Danach wurden sogenannte „wicks“, die mit 10 μl H₂O angefeuchtet worden waren, über die Elektroden gelegt. Wicks sind kleine Filterpapiere, die Salze und andere Verunreinigungen absorbieren und so die Auftrennung der Proteine verbessern. Für die Fokussierung selber wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen: Start bei 0 V, Programmende bei 10'000 V, 60'000 V-h, Dauer ca. 8 h. Die Streifen konnten nach der IEF bei -20°C über mehrere Wochen aufbewahrt werden. Die Gele für die 2. Dimension wurden in einer „Multicast“-Vorrichtung gegossen. Es wurden 12%ige, 20,5 cm hohe Gele verwendet. Die Gel-Komponenten wurden nach dem Schema in **Tabelle 3.2** gemischt und die Gele wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben gegossen. Der Kamm führte eine Tasche für den Proteinstandard und eine lange Vertiefung für den IEF-Streifen in das Sammelgel ein.

	Trenngel	Sammelgel
	12%	5%
30% Acrylamid (ml)	24	1,25
ddH ₂ O (ml)	20,4	4,3
1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	15	-
0,5 M Tris pH 6,8 (ml)	-	1,08
10% SDS (μl)	600	75
10% APS (μl)	520	25
TEMED (μl)	15	10

Tabelle 3.2: Eingesetzte Lösungen für 1 Trenn- bzw. Sammelgel für die 2D-Gelelektrophorese.

Bevor die IEF-Streifen auf die Gele geladen werden konnten, mussten sie für die Elektrophorese äquilibriert werden. Dazu wurden sie jeweils 10-30 min zuerst in Äquilibrierungspuffer mit 2% DTT, danach in Äquilibrierungspuffer mit 2,5 % Iodacetamid geschwenkt. Die Streifen wurden dann auf dem Sammelgel in low melting Agarose (0,5% in 1x TGS-Puffer) gebettet, so dass sie während der Elektrophorese nicht verrutschen. Als Standard wurden 10 µl Precision Plus Protein Standard verwendet. Detaillierte Angaben zum Handhaben der Streifen und Gele sind den jeweiligen Handbüchern zu entnehmen. Die Gele wurden in 1xTGS 1 h bei 50 V und 8-10 h bei 200 V laufen gelassen, bis die Lauffront das Ende der Platte erreicht hatte.

3.2.3.4 Coomassie-Färbung

Proteine in Polyacrylamidgelen können nach Fixierung mit dem organischen Farbstoff Coomassie-Blau visualisiert werden. Es gibt verschiedene Varianten dieses Farbstoffs, die sich in ihrer Intensität unterscheiden. Für normale Proteingele wurde Coomassie Serva Blue R von Serva, für die 2D-Gele Colloidal Coomassie Brilliant Blue G von Sigma verwendet, wobei letzteres eine höhere Sensitivität besitzt.

Minigele wurden in 10% Essigsäure 5-10 min fixiert, 10-30 min in der Färbelösung (0,1% Coomassie, 45% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt und mit 45% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden. Die 2D-Gele wurden über Nacht mit 50% Ethanol und 2% Phosphorsäure fixiert, 3x mit H₂O gewaschen, in Färbelösung (17% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 34% Methanol) 1 h inkubiert und dann für 3-4 Tage in die Färbelösung mit 1 mg/ml Farbstoff gegeben. Der Hintergrund wurde mit H₂O entfärbt. Nach der Färbung konnten die Gele in Plastikfolie eingeschweisst und bei 4°C aufbewahrt werden, oder sie wurden auf Filterpapier in einem Gelrockner getrocknet.

3.2.3.5 Westernblot-Analyse

Eine immunologische Charakterisierung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wird durch den sogenannten Westernblot ermöglicht. Dazu müssen die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Membran, meist aus Nitrozellulose, überführt werden. Dies kann erreicht werden, indem ein elektrisches Feld angelegt wird, so dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran gezogen werden. Die transferierten

Proteine können anschliessend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Ein erster Antikörper bindet an ein bestimmtes Epitop auf der Membran, und mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann diese Bindung durch Chemilumineszenz gut nachgewiesen werden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand gebracht. Die Lichtemission, die beim Absinken des angeregten Luminol in den Grundzustand entsteht, führt zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms.

Lösungen:

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol

Ponceau-Lösung: 2% Ponceau S, 30% Trichloressigsäure, 30% Sulfosalicylsäure, kurz vor Gebrauch mit dH₂O 1:10 verdünnen

Luminol: 250 mM 3-Aminophthahydrazid in DMSO

Coumarinsäure: 90 mM Coumarinsäure in DMSO

ECL-Reagenz: 50 µl Luminol, 22 µl Coumarinsäure, 3 µl H₂O₂ in 100 mM Tris-HCl pH 8,5

PAGE-Gele wurden in Transferpuffer äquilibriert und auf ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Darauf wurde die Nitrozellulose-Membran platziert, die auch im Puffer getränkt worden war, und zuletzt wurden nochmals 2 getränkte Filterpapiere aufgelegt. Es wurde immer darauf geachtet, dass alle Schichten gut durchtränkt waren und sich keine Luftblasen bildeten. Dieses „Sandwich“ wurde so auf eine „Semi-dry“-Transferapparatur gelegt, dass die Membran auf die Kathode zu liegen kam, das Gel auf die Membran. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 7 mA pro Gel für 110 min. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau-Lösung angefärbt, womit sich die Proteine in der Membran visualisieren lassen. So konnte kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war, anschliessend wurde mit TBST wieder entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Milchpulver in TBST (Blocking-Puffer) für 30 min geblockt. Danach wurde der erste Antikörper in Blocking-Puffer über Nacht appliziert (Verdünnungen s. Abschnitt 2.3). Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran mit Zweitantikörper für 4 h inkubiert (Verdünnungen s. Abschnitt 2.3). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST wurde ECL-Reaktionsreagenz auf der Membran verteilt, und diese in eine Filmkassette gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Nach einer Minute wurde der

Überschuss an Reagenz aus der Folie gestrichen und ein Photofilm für 30 s-10 min aufgelegt.

3.2.3.6 Protein-Protein-Co-Immunpräzipitierung

Die Co-Immunpräzipitierung ist eine unter vielen Möglichkeiten, eine physikalische Wechselwirkung zwischen Proteinen nachzuweisen. Das Prinzip besteht darin, ein Protein an eine Agarose- oder Sepharose-Matrix zu immobilisieren und das andere in Lösung zur Matrix zu geben. Nach Waschsritten, die unspezifische Bindungspartner eliminieren, wird das immobilisierte Protein von der Matrix eluiert, wobei auch die spezifischen Bindungspartner des Proteins in Lösung gehen. Die Proteine im Eluat können mittels PAGE getrennt und in einer Westernblot-Analyse nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Flag-gekoppelte Proteine und die potentiellen Bindungspartner in Zellen exprimiert und Anti-Flag-Antikörper gekoppelt an Agarose als Matrix verwendet.

Lösungen:

Lysis Puffer A': 130 mM NaCl, 20 mM Na₂MoO₄, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% Glycerin, 0,5% Triton-100

Zellen, die zuvor mit der Flag-gekoppelten Variante des zu untersuchenden Proteins mittels Elektroporation (vgl. 3.2.2.2) transfiziert worden waren, wurden in 500 µl Lysis Puffer A' mit 10 µl Proteaseinhibitor-Cocktail 1 h auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation bei 13'000 rpm für 4 min wurde die Proteinkonzentration mittels des BCA-Kit im Überstand bestimmt (vgl. 3.2.3.1). In der Zwischenzeit wurde die anti-Flag-Agarose entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Das Zelllysat (1-3 mg Gesamtproteinmenge) wurde mit der Agarose gemischt und auf einem Überkopf-Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Partikel dreimal mit kaltem Lysis-Puffer A' gewaschen, indem sie 30 s bei 10'000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat in 20 µl 5x Laemmli-Auftragspuffer ohne Mercaptoethanol resuspendiert, 5 min bei 96°C denaturiert, zentrifugiert und der Überstand direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.2.3.7 GST-pull-down-Assays

GST-pull-down ist eine weitere Methode um Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachzuweisen. Das Prinzip ist ähnlich wie bei der Immunpräzipitierung, allerdings

wird der zu immobilisierende Bindungspartner mittels eines GST-Epitop an eine Glutathion-gekoppelte Matrix gebunden. Die GST-fusionierten Proteine wurden in Bakterien hergestellt und die potentiellen Bindungspartner in einem *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem radioaktiv markiert.

Lösungen:

STE-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

STEN-Puffer: STE+0,5% NP-40

NETN-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40

Bakterien, die mit dem GST-gekoppelten GR transformiert worden waren, wurden in 50 ml Medium über Nacht wachsen gelassen. Die Übernachtskultur wurde in 450 ml Medium überführt, 3 h bei 37°C und 1 h bei 30°C inkubiert, die Proteinproduktion mit 1 mM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und die Bakterien nochmals 2 h bei 30°C wachsen gelassen. Die Bakterien wurden dann bei 4000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert, das Pellet 2x mit eiskaltem STE-Puffer gewaschen, in 25 ml eiskaltem STEN-Puffer resuspendiert und 3x 30s auf Eis sonifiziert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13'500 rpm für 5 min wurde der Überstand zusammen mit 0,2 mM PMSF zur Glutathion-Sepharose gegeben, die nach Angaben des Herstellers vorbereitet worden war. Die Bindung an die Sepharose erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Danach wurde 4x mit STEN-Puffer und 2x mit PBS gewaschen, die Sepharose in NETN-Puffer aufgenommen und in 200 μ l aliquotiert. ³⁵Schwefel-markiertes Cofilin, das mit dem TNT-Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers *in vitro* transkribiert und translatiert worden war, wurde zur Sepharose gegeben und erneut über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach 4maligem Waschen mit NETN-Puffer wurden die Proteine in 5x Laemmli-Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol eluiert und auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Um das radioaktive Cofilin nachzuweisen, wurde das Gel getrocknet und über Nacht bei -80°C auf einem Film exponiert.

3.3 Details zum Vorgehen in der vorliegenden Arbeit

3.3.1 Klonierungen

Die Klonierungsstrategien für die drei MMTV-Konstrukte, die für die Herstellung der parentalen Zelllinie verwendet wurden, ist in **Abb. 3.1** dargestellt. Für die übrigen

Klonierungen wurden die jeweiligen cDNAs mittels RT-PCR (Abschnitt 3.2.1.4+5) amplifiziert und in den Expressionsvektor pRK5SV40MCS oder pEGFP kloniert. Sowohl der Vektor als auch die PCR-Fragmente wurden durch einen Restriktionspaltung mit XhoI und BamHI (für Cofilin, Actin, deren Mutanten und Thioredoxin) oder HindIII (für Reticulocalbin und Hsp27) geschnitten, um überhängende Enden einzuführen. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung bei den Firmen Medigenomix oder MWG überprüft. Die für die Klonierungen und für andere Experimente verwendeten Vektoren sind in Kapitel 2 Tabelle 2.5, die Primer, die für die PCRs verwendet wurden, in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

3.3.2 Herstellung von Zelllinien

Generell wurden Zelllinien, die mindestens ein MMTV-Konstrukt integriert hatten, in Medium mit 10 % steroidfreiem FBS gehalten, allen anderen wurde das Medium mit 10% normalem FBS komplementiert.

3.3.2.1 Stabile Transfektionen

Für stabile Transfektionen wurde ExGen 500 verwendet.

Herstellung von parental1

Um die parentale Zelllinie herzustellen, wurden HeLa-Zellen mit 6 µg MMTV-TK transfiziert und dem Medium einen Tag nach der Transfektion 1000 µg/ml G418 beigefügt. Nach 16 Tagen konnten einzelne Kolonien gepickt werden. Diese wurden auf ihre induzierbare TK-Expression getestet. Der positive Klon Tk2 wurde mit je 3 µg MMTV-Puro und -EGFP transfiziert und einen Tag nach der Transfektion in Selektionsmedium gegeben, das 1 µM Dex und 3 µg/ml Puromycin enthielt. Nach

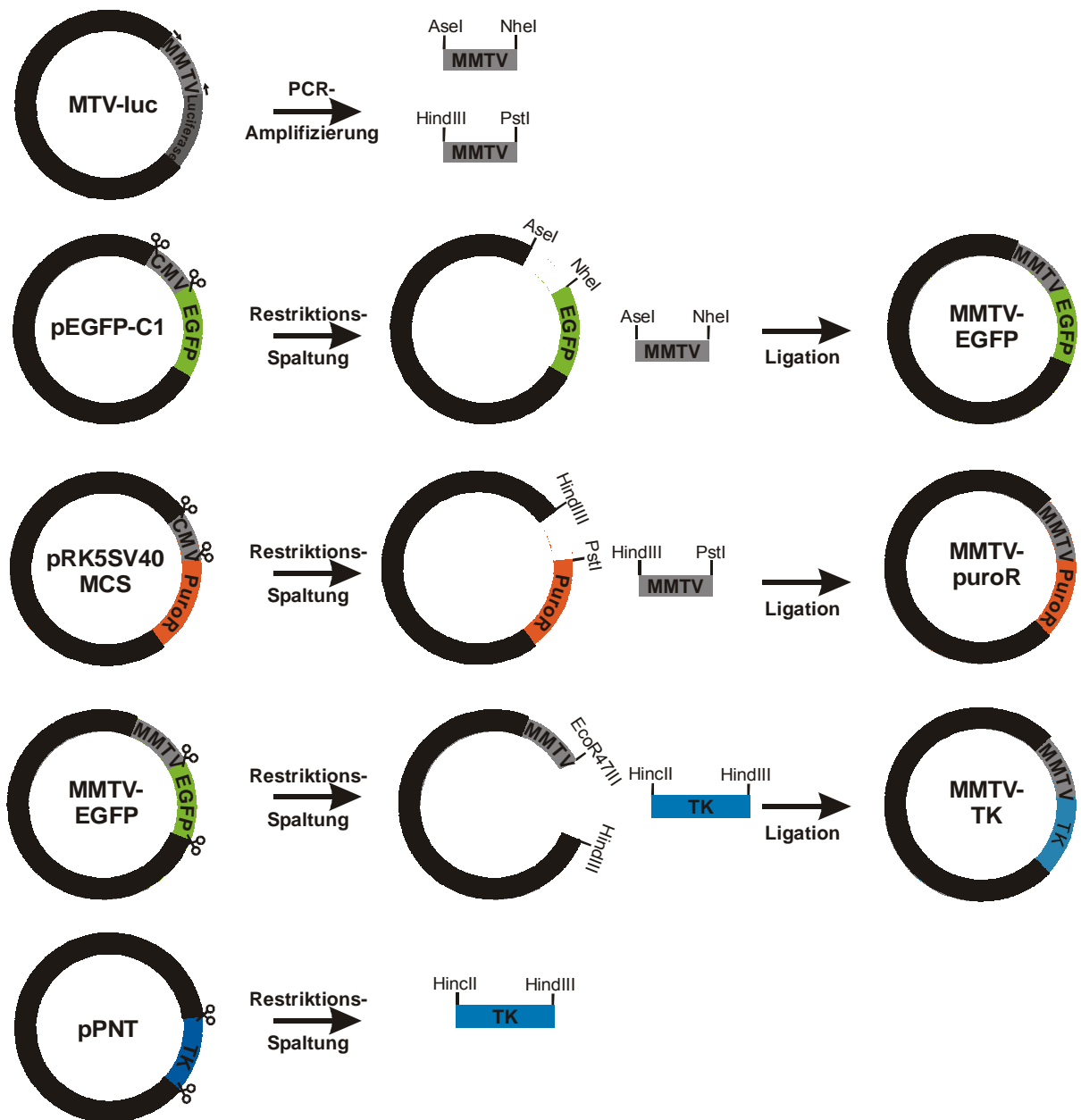


Abb. 3.1: Klonierungsschema für MMTV-TK, -EGFP und -puroR. Für die Klonierung von MMTV-EGFP wurde der MMTV-Promotor mittels PCR vom MTV-luc-Plasmid amplifiziert, mit AseI und NheI geschnitten und in den pEGFP-Vektor ligiert, aus dem zuvor mit denselben Enzymen der CMV-Promotor herausgeschnitten worden war. MMTV-puroR wurde analog hergestellt, wobei als Ausgangsplasmid pRK5SV40MCS diente und mit HindIII und PstII geschnitten wurde. Für die Herstellung von MMTV-TK wurde das TK-Gen mit HincII (glatte Ende) und HindIII aus dem Plasmid pPNT ausgeschnitten und in den MMTV-EGFP-Vektor ligiert, aus dem vorher das EGFP-Gen mit EcoR47III (glatte Ende) und HindIII herausgeschnitten worden war.

jeweils 3 Tagen wurden Dex und Puromycin für 24 h abgesetzt. Nach 15 Tagen konnten einzelne Kolonien gepickt werden. Die FACS-Analyse der gepickten Klone ergab, dass es sich nicht um monoklonale Kolonien handelte; deswegen wurde eine Population subkloniert, indem eine Zelle pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät wurde. Einer der Subklone wurde dann die parentale Zelllinie parental1.

Herstellung von c1

Um die Zelllinie c1, die Cofilin stabil exprimiert, herzustellen, wurden HeLa-Zellen mit 6 µg pRK5cof transfiziert und einen Tag nach der Transfektion in Medium mit 5 µg/ml Puromycin kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die überlebenden Zellen in eine 96-Lochplatte (eine Zelle pro Loch) ausgesät. Diese monoklonalen Linien konnten dann auf ihre Cofilin-Expression getestet werden.

3.3.2.2 Herstellung der Hormon-resistenten Zellen

Parental1-Zellen wurden in 150 mm²-Flaschen bis zur Konfluenz wachsen gelassen und dann mit 1-5 µg/ml ICR 191 (gelöst in H₂O) oder 50-200 µg/ml ENU (gelöst in H₂O) für 3 bzw. 24 h behandelt. Die Menge des Mutagenese-Reagenz wurde so gewählt, dass zwischen 70 und 90% der vorhandenen Zellen innerhalb einer Woche starben. Nach der Behandlung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in steroidfreiem Medium wieder bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Diese Prozedur wurde mindestens zweimal wiederholt, danach entweder erneut mutiert oder die Zellen in 96-Lochplatten (1 Zelle pro Loch) ausgesät, wo dann die Selektion stattfand. Dafür wurden die Zellen mindestens 7 Tage in den 96-Lochplatten ohne Selektionsdruck wachsen gelassen, danach wurden 10 µg/ml Ganciclovir und 1 µM Dex zum Medium gegeben. Nach jeweils 3 Tagen wurden Ganciclovir und Dex für 24 h abgesetzt. Nach 2-3 Wochen Selektion konnten die Zellen auf ihre Hormonresistenz getestet werden.

3.3.2.3 Zellfusionen

Um Fusionslinien zwischen den mutierten Zellen und den MTV-luc-Zellen (Linie mit stabil integriertem MMTV-luc-Plasmid) oder c1 und parental1 zu generieren, wurden die jeweiligen Zelllinien 1:1 in 60 mm Schalen ausgesät. Wenn sie 80% Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und 1 ml 50% Polyethylenglycol (Hybri Max-PEG-Lösung, Sigma) für 1 min zugegeben. Es folgten 4 Waschschrte mit 0,3,

0,6, 1,2 und 2,4 ml Medium für 5 min. Die Zellen konnten sich über Nacht erholen, danach wurden sie erst 3 µg/ml Puromycin für 4 Tage, und nachfolgend in 500 µg/ml G418 für 7 Tage selektiert.

3.3.3 Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien

3.3.3.1 RT-PCR

Die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen wurde mittels Trizol^R oder dem RNeasy-Kit isoliert (Abschnitt 3.2.1.2). Für die RT-Reaktion wurde MuIV-RT benützt. Die für die PCR verwendeten Primer und Bedingungen sind in Abschnitt 2.6 zusammengefasst. Für Klonierungen und Sequenzierungen wurden 30 Zyklen durchgeführt, für Quantifizierungen und Vergleiche zwischen Zelllinien jeweils 24 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mit einem Gel-Imaging-System (Kodak Image Station 440CF and Kodak 1D Image Analysis software) quantifiziert. Es wurde immer auch eine PCR-Reaktion für GAPDH mitgeführt und die Intensitäten der PCR-Produkte auf die GAPDH-Intensität normalisiert. Die Sequenzierungen wurden von Medigenomix oder MWG durchgeführt.

3.3.3.2 MTT-Assays

Die Zellen wurden so in 96-Lochplatten ausgesät, dass sich 1000 Zellen in einem Loch befanden. Für die Messung der TK-Aktivität wurden sie 1 µM Dex oder EtOH und verschiedenen Konzentrationen von Ganciclovir ausgesetzt, nach 3 Tagen wurde das Hormon und Ganciclovir für 24 h abgesetzt und danach für weitere 3 Tage appliziert. Puromycin wurde in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 1 µM Dex oder EtOH während 3 Tagen gegeben. Die Überlebensrate der Zellen wurde dann anhand der Inkorporation von MTT (Abschnitt 3.2.2.2) gemessen.

3.3.3.3 GFP-Messung mittels FACS und Westernblots

Um die Expression von EGFP zu messen, wurden die Zellen für 48 h mit 1 µM Dex behandelt. Danach wurden sie entweder in Lysispuffer A' für die Westernblotanalyse lysiert oder trypsinisiert, in 500 µl PBS + 3 % FBS resuspendiert und im FACS analysiert. Von den Lysaten wurden 40 µg Gesamtprotein mittels PAGE auf einem 12%igem Gel aufgetrennt, und EGFP mit dem GFP-Antikörper (Abschnitt 2.3) detektiert.

3.3.3.4 Reporterassays

Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen mittels Elektroporation (Abschnitt 3.2.2.3) mit den Reporterplasmiden (3 μg MTV-luc, 5 μg coll-luc/6xNF κ B-luc) und 2.5 μg des β -Galactosidase-Expressionsvektors pCMV β -Gal transfiziert. Falls weitere Gene koexprimiert werden sollten, wurden diese in den angegebenen Mengen zugesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen 16-48 h mit Hormon, PMA oder Vehikel in Medium mit 5 % steroidfreiem FBS behandelt und Luziferase- und β -Galactosidaseassays in Duplikaten durchgeführt (Abschnitt 3.2.2.4).

3.3.4 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Die 2D-Gelelektrophorese wurde wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben durchgeführt und die Proteine mit Colloidal Coomassie Brilliant Blue G (Abschnitt 3.2.3.4) gefärbt. Die Intensitäten zwischen den verschiedenen Zelllinien wurde mit PDQuest 2D-Gel-Analysesoftware verglichen. Als unterschiedlich wurde die Intensität dann bezeichnet, wenn sie sich um mindestens einen Faktor 2 unterschied.

Um Proteinspots zu identifizieren, wurde Massenspektrometrie (MS) verwendet. Die Spots wurden zunächst aus dem Gel herausgeschnitten. Um SDS und Coomassie aus dem Gel zu entfernen und den pH für den Trypsin-Verdau einzustellen, wurden die Gelstücke 3x mit je 35 μl 20 mM Ammoniumbicarbonat und Acetonitril bei 37°C für 30 min inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Gelstücke über Nacht getrocknet. Für den Trypsin-Verdau wurden 1 μg Trypsin in 25 μl 20 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Gelstücke wurden dann zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß transferiert. Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelstücke 2x mit 25 μl 5% Ameisensäure bei 37°C inkubiert und die Überstände mit dem ersten vereinigt. Die Peptide wurden mittels HPLC (engl.: high performance liquid chromatography) auf einer Nano-Säule (RP-C18, 75 μm Durchmesser, 10 cm Länge) aufgetrennt und dann direkt mittels online Tandem-MS mit einer Ionenfalle (LCQ Deca Xplus) analysiert. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit einer nicht-redundanten FASTA-Proteindatenbank verglichen, um die Identität der Proteine festzustellen.

3.3.5 Methoden zur Untersuchung von Kandidaten-Proteinen

3.3.5.1 Northernblot-Analyse

Mit Trizol^R-Reagenz wurde die Gesamt-RNA aus 10^7 Zellen aufgereinigt. 20 µg dieser RNA wurde dann für die Northernblot-Analyse (Abschnitt 3.2.1.4) eingesetzt. Als Sonden wurden ³²P-markierte cDNAs verwendet, die mit den Primern in Abschnitt 2.6 von RNA amplifiziert und dann mit dem Megaprime DNA labelling system-Kit von Amersham markiert wurde. Die Hybridisierungstemperaturen wurden wie folgt gewählt: 55 °C für Cofilin und Reticulocalbin, 65 °C für Hsp27, Thioredoxin und GAPDH. Gewaschen wurde für Cofilin und Reticulocalbin 2x 15 min mit 2x SSPE/0,1 % SDS; für Thioredoxin und GAPDH 2x 10 min mit 2x SSPE/0,1 % SDS und 3x 15 min mit 1x SSPE/0,1 % SDS; für Hsp27 2x 10 min mit 2x SSPE/0,1 % SDS, 1x 15 min mit 1x SSPE/0,1 % SDS und 1x 15 min mit 0,5x SSPE/0.1 % SDS. Der Film wurde über Nacht exponiert.

3.3.5.2 Co-Immunpräzipitierung und GST-pull-down

Für die Co-Immunpräzipitierung wurden HEK-Zellen mit 10 µg pRK5cof oder pRK5cof-flag und 10 µg flag-GR oder pRK7GR mittels Elektroporation (Abschnitt 3.2.2.3) transfiziert. Die Präzipitierungen wurden wie in Abschnitt 3.2.3.6+7 beschrieben durchgeführt.

3.3.5.3 Phalloidinfärbung des Actin-Cytoskeletts und Fluoreszenzanalyse

HeLa-Zellen wurden mit ExGen (Abschnitt 3.2.2.3) entweder mit 1 µg pRK5SV40MCS oder pRK5cof pro Loch für die Phalloidinfärbung oder mit 0,25 µg GFP-GR und 0,75 µg des zu untersuchenden Proteins pro Loch für die Fluoreszenzanalyse transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit Hormon oder Vehikel oder 1 h mit Cytochalasin B behandelt. Für die Phalloidinfärbung wurden die Zellen nach der Fixierung 5 min mit kaltem Aceton und 10 min mit 0,1% Triton-X in PBS permeabilisiert und anschliessend 40 min mit TRIC-gekoppeltem Phalloidin (50 µg/ml in PBS mit 0,1% Triton-X) gefärbt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzanalysen erfolgte mittels einer Methode aus der Literatur (Galigniana et al., 1998): Die Zellen wurden auf einer Skala von -2 bis +2 eingeteilt, wobei -2 einen Zustand bezeichnet, in dem alle Rezeptormoleküle im Cytoplasma zu finden sind, -1 hauptsächlich im Cytoplasma, 0

bezeichnet Gleichverteilung zwischen Cytoplasma und Kern, +1 hauptsächlich im Kern verteilt und +2 ausschliesslich im Kern. Alternativ wurden in konfokale Lasermikroskopbildern die Pixeldichte von Cytoplasma und Kern mit dem Programm Image-J ermittelt und der Quotient der Werte berechnet.

4. Resultate

4.1 Herstellung Hormon-resistenter Zelllinien

4.1.1 Vorüberlegungen

Für die erfolgreiche Durchführung eines funktionellen Screens wurden vorab folgende Überlegungen angestellt:

- Welche Zelllinie soll gewählt werden?
- Welcher Selektionsmarker soll eingeführt werden?
- Welcher Promotor soll den Selektionsmarker treiben?
- Bleibt die GR-Aktivität bei chronischer Hormongabe konstant?
- Wie soll die Mutagenese durchgeführt werden?
- Welche Kontrollen sollen mitgeführt werden?

Der Screen wurde in HeLa-Zellen durchgeführt, die von einem humanen Zervix-Adenocarcinom stammen, zum einen, weil es menschliche Zellen sind, zum anderen weil diese Zellen sehr robust sind und schnell wachsen. Letzteres war ein wichtiges Kriterium in Anbetracht der Tatsache, dass die Zellen während der Mutagenese und Selektion über Monate in Kultur gehalten werden mussten.

Als Selektionsmarker wurde die Thymidinkinase des Herpesvirus (TK) gewählt. TK wandelt Ganciclovir in ein zytotoxisches Nucleosidanalogen um, sodass Zellen sterben, die TK exprimieren und Ganciclovir ausgesetzt sind. Der Vorteil dieses Systems ist, dass Ganciclovir erst bei relativ hoher TK-Expression toxisch ist, und die Selektion deswegen auch dann funktioniert, wenn der Promotor eine hohe basale Transkription zulässt (Li et al., 1999). Ausserdem ist Ganciclovir ein schlechtes Substrat für die humane TK, so dass nicht eine Zelllinie ohne TK-Gen gewählt werden musste.

Um das Absterben der Zellen von Hormongabe abhängig zu machen, wurde der GC-responsive MMTV (engl.: mouse mammary tumor virus)-Promotor vor das Herpesvirus TK-Gen geschaltet. Der MMTV-Promotor wurde gewählt, weil er mehrere Glucocorticoid-responsive Elemente (GREs) enthält, so dass er stark induzierbar ist. Ausserdem ist er gut charakterisiert und wird oft als Modellpromotor für die Untersuchung des GRs verwendet.

Der MMTV-Promotor birgt den Nachteil, dass er bei lange anhaltender Hormongabe seine Sensitivität gegenüber dem Hormon verliert (Lee and Archer, 1998). Ausserdem ist bekannt, dass die Rezeptormenge durch chronisch erhöhte Hormonspiegel herabreguliert werden kann (Wallace and Cidlowski, 2001). Deswegen musste die Frage geklärt werden, ob die GR-Aktivität und somit die Expression eines Markergens konstant bleibt, wenn die Zellen wochenlang Hormon ausgesetzt sind. Dies wurde im Vorfeld mit einer schon etablierte Zelllinie getestet, die ein Luziferasegen getrieben vom MMTV-Promotor stabil integriert hat. Die Luziferase wandelt ihr Substrat Luziferin unter Emission von Licht um, und da die gemessene Lichtemission proportional zur über den MMTV-Promotor gebildeten Luziferasemenge ist, lässt sich hiermit die GR-Aktivität bestimmen. Diese Zellen wurden verschiedenen Hormongabeprotokollen unterworfen, und die GR-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Luziferaseaktivität bei konstanter Verabreichung von Hormon spätestens nach 4 Tagen fast nicht mehr messbar ist. Wenn das Hormon hingegen alle 3 Tage für 24 Stunden abgesetzt wurde, blieb die Luziferaseaktivität beinahe konstant. Es war anzunehmen, dass auch die TK-Expression mit diesem Protokoll konstant gehalten werden konnte, was Voraussetzung für die Selektion war.

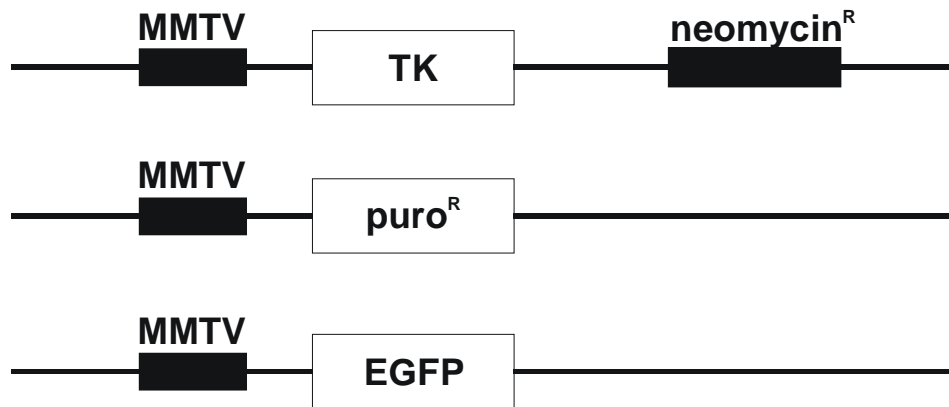
Die Zellen sollten chemisch mutiert werden; als Agenzien wurden ICR 191 und ENU (engl.: ethylnitrosourea) verwendet. ICR191 interkaliert in die DNA und verhindert damit die Ausbildung von Basenpaaren, was zur Verschiebung des Leseraster der kodierenden DNA führt (Taft et al., 1994). ENU führt Punktmutationen in die DNA ein (Shibuya and Morimoto, 1993). Der Vorteil von Leserasterverschiebungen ist, dass sie in den meisten Fällen zum frühzeitigen Abbruch der Proteinkette führen, und die betroffenen Gene somit gar nicht mehr zu einem Proteinprodukt führen können, was meist einen ausgeprägten Phänotypen ergibt. Punktmutationen hingegen können die Aminosäuresequenz verändern, was die Funktion des Proteins beeinträchtigen kann. Damit führen Punktmutationen zwar meistens zu einem schwächeren Phänotypen, ist die Mutation aber identifiziert, kann gleich gefolgert werden, welche Aminosäuren für die Funktion des Proteins wichtig sind. Um die Stärken beider Ansätze zu nutzen, wurde sowohl ICR191 als auch ENU verwendet.

Als Kontrollen für die Selektion wurden zusätzlich EGFP (engl.: enhanced green fluorescent protein) und die Puromycin-Acetyltransferase, die Puromycinresistenz ($puro^R$) vermittelt, unter MMTV-Kontrolle eingeführt. Die Expression beider Gene ist

leicht nachzuprüfen. Die Puromycinresistenz wurde auch verwendet, um die Möglichkeit offen zu halten, mutierte Gene nach der Selektion durch die Transfektion einer Expressionsbibliothek zu identifizieren. Nach Transfektion würden nur die Zellen in Puromycin und Hormon überleben, in die das defekte Gen transfiziert worden ist, und die damit wieder hormonresponsiv geworden sind.

Da nur die GR-Signaltransduktion untersucht werden sollte, wurde kein natürliches GC verwendet, sondern Dexamethason (Dex), ein synthetisches Glucocorticoid, das spezifisch den GR aber nicht den MR aktiviert.

Das nach diesen Überlegungen entworfene Konzept für den funktionellen Screen ist schematisch in **Abb. 4.1** dargestellt.



↓ Stabile Transfektion
in HeLa Zellen

parental1

Bedingungen:	Ganciclovir	Ganciclovir+GC	Puromycin	Puromycin+GC
Überleben:	+	-	-	+
Fluoreszenz:	-	+	-	+

↓ Mutagenese

↓ Selektion in Ganciclovir+Dex

Mutierte GC-resistente Zellen

Bedingungen:	Ganciclovir	Ganciclovir+GC	Puromycin	Puromycin+GC
Überleben:	+	+	-	-
Fluoreszenz:	-	-	-	-

Abb. 4.1: Konzept des funktionellen Screens. Die Tabellen beschreiben die Eigenschaften der Ausgangszelllinie ("parental1") und der mutierten Zellen.

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Ausgangszelllinie

HeLa Zellen wurden mit MMTV-TK-Plasmid transfiziert und in G418 selektiert. G418 ist ein Neomycinanalogon und konnte zur Selektion verwendet werden, da der Vektor zusätzlich über eine Neomycinresistenz verfügte. Die überlebenden Klone wurden mittels RT-PCR auf Expression und Induzierbarkeit der TK getestet (**Abb. 4.2A**).

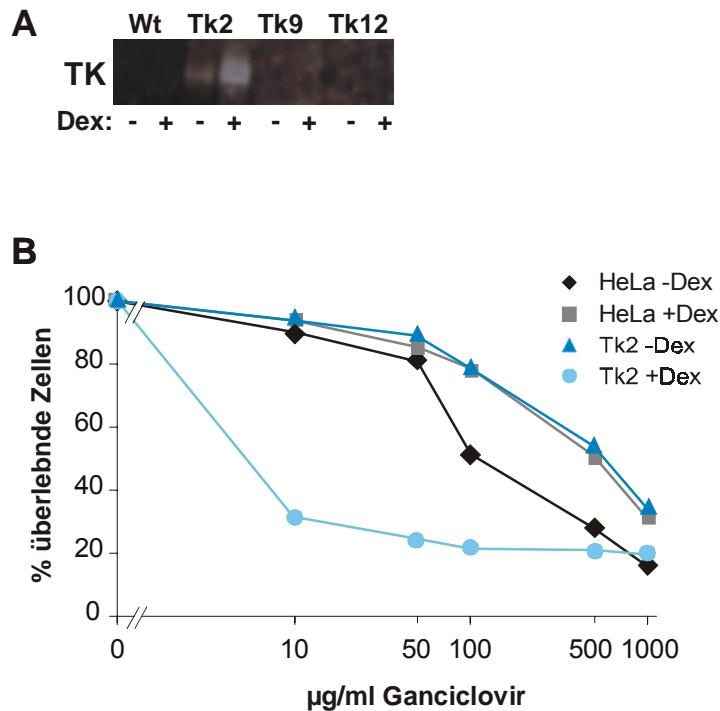


Abb. 4.2: Klon 2 exprimiert TK hormoninduzierbar. (A) Drei Klone wurden auf die Induzierbarkeit von TK getestet. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit 1 µM Dex stimuliert und mit der Gesamt-RNA RT-PCRs für TK durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentatives Agarosegel. **(B)** Tk2 wurde in einem MTT-Assay auf das Überleben in Ganciclovir und Dex getestet und mit Wildtyp-Zellen verglichen. Die Zellen wurden 7 Tage lang mit verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir mit oder ohne 1µM Dex behandelt, wobei nach dem 3. Tag für 24 h Medium ohne Hormon und Antibiotikum gegeben wurde. Danach wurde der MTT-Assay durchgeführt.

Klon Tk2 zeigte TK-Expression, die mit Dex induzierbar war (**Abb. 4.2A**). Um diesen Befund weiter abzustützen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt, womit die Überlebensrate der Zellen gemessen werden konnte, nachdem sie mit Hormon und verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir behandelt worden waren (**Abb. 4.2B**). Es überlebten deutlich weniger Tk2-Zellen als Wildtypzellen in Dex- und ganciclovirhaltigem Medium, was den Befund bestätigte, dass Tk2 hormonresponsiv TK exprimierte. Tk2 wurde dann mit MMTV-EGFP- und MMTV-Puro-Plasmid transfiziert und in Dex und Puromycin selektiert. Die überlebenden Zellen wurden im FACS (engl.: fluorescence activated cell sorter) auf EGFP-Expression getestet. Einige Klone zeigten induzierbare EGFP-Expression, allerdings liess die FACS-

Analyse vermuten, dass es sich nicht um monoklonale Zellen handelte. Deswegen wurde Klon 6 subkloniert, indem 1 Zelle pro Loch in 96-Lochplatten ausgesät wurde. Die resultierenden Klone wurden wiederum im FACS getestet. Klon 6/8 exprimierte EGFP, und die Expression wurde durch Hormongabe um das zehnfache gesteigert (**Abb. 4.3A**). Um dieses Resultat zu bestätigen, wurden Westernblot-Analysen mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper durchgeführt. Wie **Abb. 4.3B** deutlich zeigt, konnte die Hormon-induzierbare EGFP-Expression in Klon 6/8 verifiziert werden.

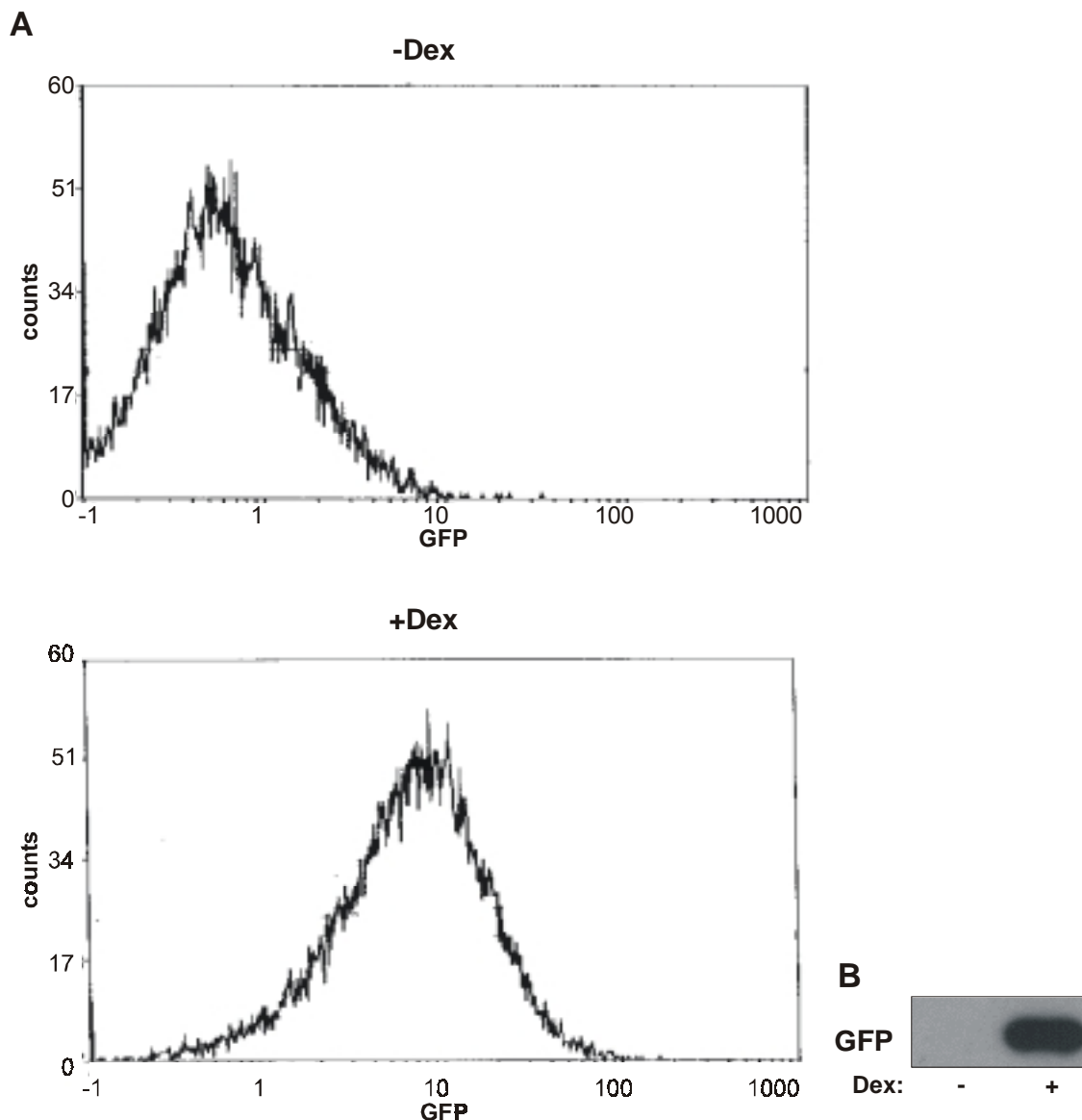


Abb. 4.3: In Klon 6/8 ist die EGFP-Expression hormon-induzierbar. Zellen wurden 48 h mit 1 μ M Dex behandelt und dann im FACS analysiert (**A**) oder lysiert und mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper im Westernblot untersucht (**B**).

Um sicher zu stellen, dass Klon 6/8 wirklich alle drei Konstrukte stabil integriert hatte, wurden MTT-Assays durchgeführt in denen nochmals die hormonabhängige Expression von TK (**Abb. 4.4A**) und zusätzlich die der Puromycinresistenz (**Abb. 4.4B**) getestet wurden.

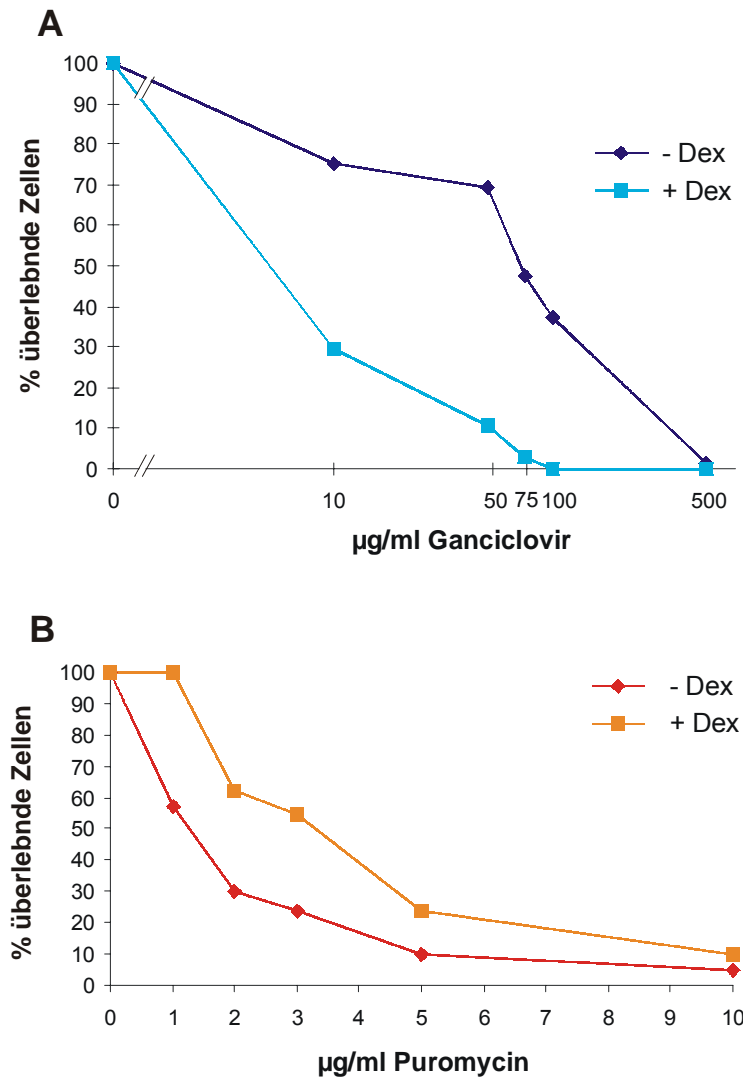


Abb. 4.4: Klon 6/8 exprimiert hormonabhängig TK und eine Puromycinresistenz. (A) 6/8-Zellen wurden 7 Tage lang mit verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir mit oder ohne 1 µM Dex behandelt, wobei nach dem 3. Tag für 24 h Medium ohne Hormon und Antibiotikum gegeben wurde. Die Überlebensrate der Zelle wurde danach mittels MTT-Assay gemessen. **(B)** 6/8-Zellen wurden wie in (A) behandelt, ausser dass verschiedene Konzentrationen an Puromycin verabreicht wurden.

Die Assays ergaben, dass ca. 75% aller 6/8-Zellen mit 1 µM Dex und 10 µg/ml Ganciclovir sterben, ohne Dex hingegen zu 80% überleben, umgekehrt bei 1 µM Dex und 1 µg/ml Puromycin 100% der Zellen überleben, ohne Dex aber ca. die Hälfte stirbt. Aus diesen Experimenten wurde gefolgert, dass Klon 6/8 eine geeignete Ausgangszelllinie für die Herstellung GC-resistenter Zellen ist. Der Einfachheit halber wurde Klon 6/8 in parental1 (Parentale Zelllinie 1) umbenannt.

4.1.3 Mutagenese und Selektion von parental1

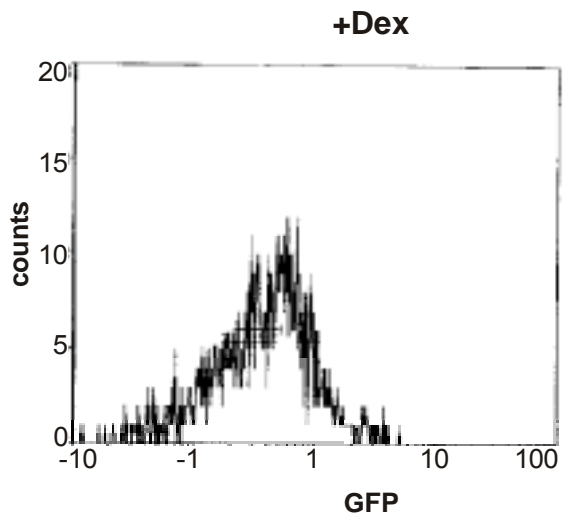
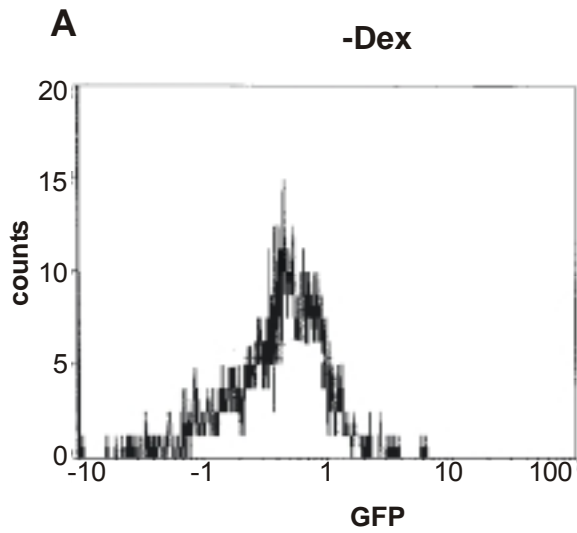
Parental1-Zellen wurden entweder mit ICR191 oder mit ENU mutiert. Die Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen von ICR191 oder ENU ausgesetzt, so dass 70-90% der Zellen innerhalb einer Woche nach der Behandlung starben. Nachdem sich die Zellen erholt hatten und wieder konfluent waren, wurden sie einer erneuten Mutationsrunde ausgesetzt. Dieses Prozedere wurde mindestens dreimal wiederholt, danach wurden die Zellen entweder noch weiter mutiert oder in 96-Lochplatten ca. 1 Zelle pro Loch ausgesät. Dort fand die Selektion mit 1 µM Dex und 10 µg/ml Ganciclovir statt, jeweils nach 3 Tagen wurden Ganciclovir und Dex für 24 h abgesetzt. Nach der Selektion wurde im FACS die EGFP-Expression und in MTT-Assays die TK- und puro^R-Expression getestet. Es stellte sich heraus, dass viele der isolierten Klone entweder falsch positiv waren, d.h. trotz induzierbarer TK-Expression überlebt hatten, oder nur eine Mutation im TK-Gen oder -Promotor hatten. Eine Übersicht über die Klone ist in **Tabelle 4.1** gegeben.

Klon	Mutierendes Reagenz	Eigenschaften	Differentiell exprimierte Proteine
1.3/1	ICR191	Mutation im TK- Gen oder Promotor	
1.3/2=mut1	ICR191	Mutation in trans	Thioredoxin (1 [*]), Cofilin (2 [*]), Hsp27 (3 [*]), Reticulocalbin (4 [*])
1.3/3	ICR191	Mutation im TK- Gen oder Promotor	
1.3/4	ICR191	falsch positiv	

1.3/5	ICR191	falsch positiv	
1.3/6	ICR191	falsch positiv	
1.3/7	ICR191	falsch positiv	
1.4/1	ICR191	Mutation im TK- Gen oder Promotor	
2.3	ICR191	falsch positiv	
3.3	ICR191	falsch positiv	
5.3/2=mut2	ICR191	Mutation in trans	Noch nicht bekannt
ENU5=mut3	ENU	Mutation in trans	Noch nicht bekannt

Tabelle 4.1: Überblick über die Klone, die nach der Mutagenese und der Selektion isoliert werden konnten. *Entspricht Nummerierung in Abb. 4.8. „Falsch positiv“ werden Klone genannt, die überlebten, obwohl sie eine normale Hormonantwort zeigen.

Drei Klone, die mut1, mut2 und mut3 genannt wurden, zeigten nach der Selektion reduzierte Induktion der drei Markerproteine. Die EGFP-Expression wurde wiederum im FACS (für mut1 **Abb. 4.5A**) und Westernblot-Analyse (**Abb. 4.5A**) gemessen, für TK- und puro^R-Induktion wurden erneut MTT-Assays durchgeführt (**Abb. 4.5B und C** für mut1 und mut3). Alle 3 Klone zeigten eine reduzierte Hormonantwort. Eine simple Erklärung hierfür wäre, dass das GR-Gen selbst mutiert wurde (Mutation in cis), was zu einer Veränderung der Expressionsrate oder der Aminosäuresequenz führen könnte. Um ersteres abzuklären, wurden die GR-Proteinmengen vom mut1-3 mit parental1 verglichen. Wie die Westernblot-Analyse in **Abb. 4.5D** zeigt, konnten weder vor noch nach Hormongabe Unterschiede zwischen den Proteinmengen in den verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Um zusätzlich die kodierende Sequenz des GR-Gens zu überprüfen, wurde er in mut1-3 mittels RT-PCR amplifiziert und komplett durchsequenziert. In keiner der drei resistenten Zelllinien konnte eine Mutation gefunden werden. Daraus liess sich schliessen, dass die Mutationen nicht den GR selbst betreffen, sondern Faktoren, welche die GR-Funktion beeinflussen (Mutation in trans). Die Strategie war nun, eine dieser GC-resistenten Zelllinien im Detail zu analysieren und dabei Kandidaten zu identifizieren, die für die Regulation des GRs wichtig sein könnten. Es wurde Klon mut1 gewählt, da seine Hormonantwort am stärksten reduziert war (vgl. die GFP-Induktion in **Abb. 4.5A** unten).



Zelllinie: mut1 mut3 parental1



Dex: - + - + - +

Zelllinie: parental1 mut2



Dex: - + - +

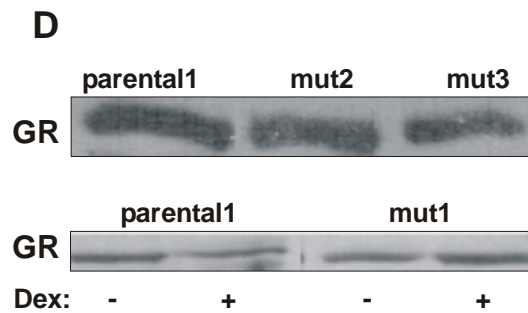
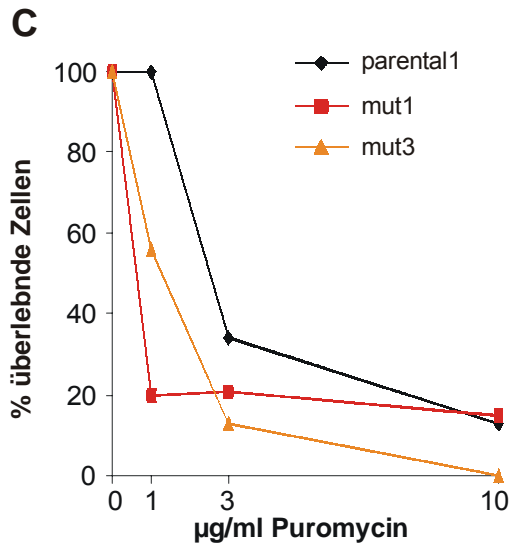
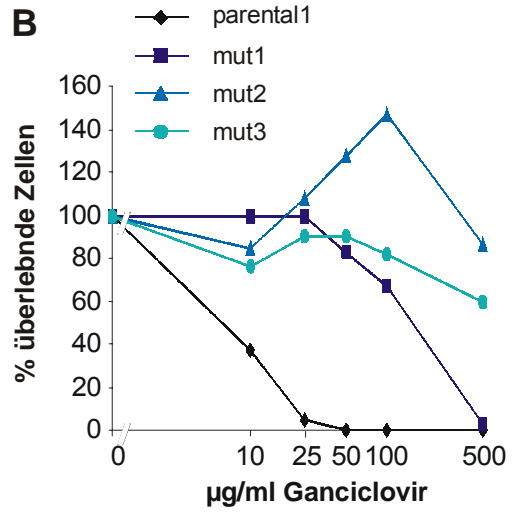


Abb. 4.5: Charakterisierung von 3 mutierten Zelllinien. (A) Messung der hormonabhängigen Expression von EGFP. Oben ist die FACS-Analyse von mut1 nach Stimulierung mit 1 μ M Dex für 48 h dargestellt. Unten sind repräsentative Westernblots der Zelllysate von mut1, mut2 und mut3 nach Stimulierung mit 1 μ M Dex für 48 h gezeigt. **(B)** MTT-Assay zur Messung der hormoninduzierten TK-Expression. Die Zellen wurden 7 Tage lang mit verschiedenen Konzentrationen an Ganciclovir und 1 μ M Dex behandelt, wobei nach dem 3. Tag für 24 h Medium ohne Hormon und Antibiotikum gegeben wurde. Die Überlebensrate der Zelle wurde danach mittels MTT-Assay gemessen. **(C)** MTT-Assay zur Messung der hormoninduzierten Puromycinresistenz. Es wurde wie in (B) vorgegangen, ausser dass verschiedene Konzentrationen von Puromycin verwendet wurden. **(D)** Zellen wurden 48 h mit 1 μ M Dex stimuliert, lysiert und die GR-Mengen auf einem Westernblot verglichen. Gezeigt sind repräsentative Blots.

4.2 Detaillierte Analyse von mut1

4.2.1 Die Hormonresistenz in mut1 ist unabhängig vom chromosomalen Kontext

Um die reduzierte Antwort von mut1 auf Dex zu bestätigen, wurden Reporterassays durchgeführt. Als Reporter diente ein Luziferasegen, getrieben vom MMTV-Promotor. Mut1 zeigte eine 3-4fach reduzierte Luziferaseaktivität nach Dex-Gabe verglichen mit parental1 Zellen (**Abb. 4.6A**).

Es ist bekannt, dass es GR-regulierende Cofaktoren gibt, die spezifisch für den MMTV-Promotor sind. Deswegen wurde untersucht, ob auch das Metallothionein (MT)-I-Gen, ein endogenes GC-responsives Gen, nach Hormongabe eine reduzierte Induzierbarkeit zeigt. Die Transkriptionsrate von MT-I wurde mittels RT-PCR bestimmt. Auch in diesem System war die Hormonantwort in mut1 geringer als in parental1, und zwar um einen Faktor 6-7 (**Abb. 4.6B**).

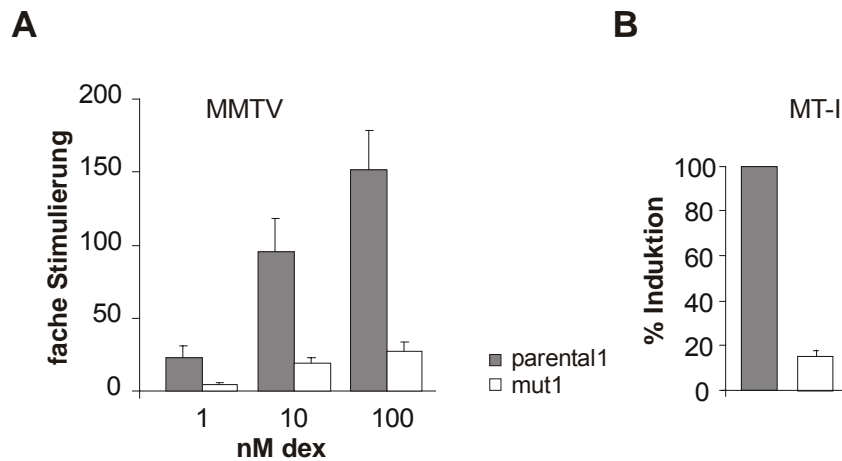


Abb. 4.6: Die Hormonantwort in mut1-Zellen ist unabhängig vom chromosomalen Kontext reduziert. (A) Vergleich von parental1- und mut1-Zellen in transienten Luziferaseassays. Die Zellen wurden mit MTV-luc und pCMV β Gal transfiziert und 16 h mit verschiedenen Dex-Konzentrationen stimuliert. Dargestellt ist die auf den unstimulierten Wert normierte Luziferaseaktivität, gemittelt über 5 unabhängige Experimente, +SEM. **(B)** Vergleich der MT-I-mRNA-Induktion in parental1 und mut1. Die Zellen wurden für 24 h mit 1 μ M Dex stimuliert, danach wurde die Gesamt-RNA präpariert und RT-PCR für MT-I durchgeführt. Die Induzierbarkeit in parental1 wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten +SEM.

Aus diesen Experimenten wurde gefolgert, dass die reduzierte Antwort in mut1 unabhängig vom Promotor und dessen chromosomalen Kontext ist. Die GC-Resistenz gilt also sowohl für ektopische (stabil integrierte wie transient transfizierte) als auch für endogene Gene.

4.2.2 Eine dominante Mutation führt zur reduzierten Hormonantwort in mut1 Zellen

Als nächstes sollte geklärt werden, ob eine dominante oder eine rezessive Mutation bewirkt, dass mut1-Zellen weniger Hormon-responsiv sind. Dazu wurden mut1 Zellen mit Zellen fusioniert, die das MMTV-Luziferase-Plasmid stabil integriert haben (MTV-luc Zelllinie). Wäre die Mutation rezessiv, würden die fusionierten Zellen eine ähnliche Induzierbarkeit der Luziferase zeigen wie die MTV-luc Zellen, und auch die anderen Marker (TK, GFP, Puro) würden wieder induzierbar sein. Eine dominante Mutation würde hingegen auch in den fusionierten Zellen zu einer verminderten Luziferaseaktivität führen. Die Eigenschaften einer der Fusionsklone, s6, ist in **Abb.**

4.7 dargestellt. Die Stimulierbarkeit der Luziferaseaktivität war in s6 um das 3fache reduziert (**Abb. 4.7A**) und die EGFP-Induktion konnte durch die Fusion nicht wieder hergestellt werden (**Abb. 4.7B**). Diese Befunde konnten in zwei weiteren Fusionsklonen bestätigt werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Mutation, die zur Reduktion der GR-Signaltransduktion in mut1 führt, dominant sein muss.

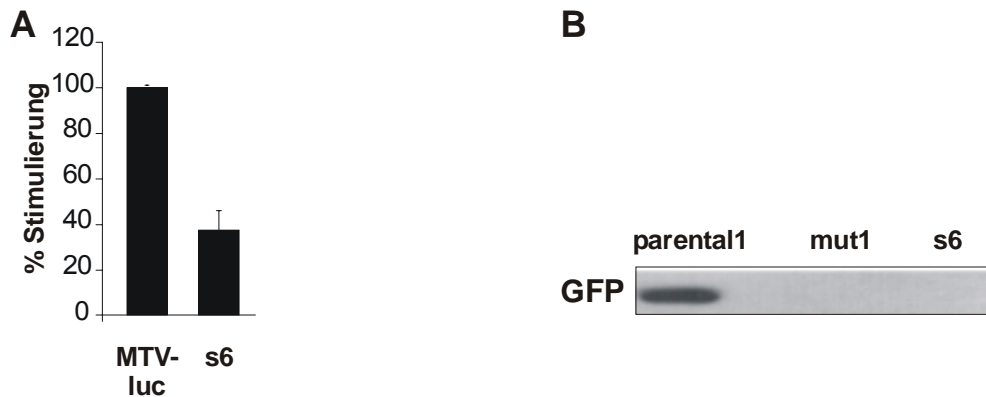


Abb. 4.7: Analyse von s6, einer Fusionszelllinie von mut1 und MTV-luc-Zellen. (A) Messung der endogenen Luziferaseaktivität in MTV-luc und s6. Die Zellen wurden 16 h mit 1 μ M Dex stimuliert, lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Aktivität in MTV-luc-Zellen wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten +SEM. **(B)** Messung der EGFP-Expression in parental1, mut1 und s6. Die Zellen wurden 48 h mit 1 μ M Dex stimuliert, und das Lysat in Westernblots analysiert. Ein repräsentativer Blot ist abgebildet.

4.2.3 Proteomische Analyse der mut1-Zelllinie ergibt Thioredoxin, Hsp27, Reticulocalbin und Cofilin 1 als Kandidatengene

Zu Beginn des Projekts wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, um zu untersuchen, welche Proteine für die reduzierte Hormonantwort verantwortlich sind. Einerseits wurde erwogen, die Zellen mit einer Expressionsbibliothek zu transfizieren und in Puromycin und Dex rückzuselektionieren. Überlebt hätten nur Klone, die durch das transfizierte Gen wieder hormonresponsiv geworden wären. Dieses Vorgehen wurde nicht gewählt, da sich die Puromycinresistenz zwar gut als Kontrollmarker eignete, aber nicht sehr gut induzierbar war (vgl. Abb. 4.4B), und deswegen entweder mit vielen falsch positiven Klonen oder sehr wenig überlebenden Zellen gerechnet werden musste. Andererseits bestand die Möglichkeit, die mutierten

Zellen mit den parentalen entweder auf cDNA- oder auf Protein-Ebene zu vergleichen, das heisst, eine Microarray-Analyse beziehungsweise 2D-Gelelektrophorese und anschliessende massenspektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Dies ist möglich, weil Mutationen in der DNA zu einem beschleunigten Abbau der resultierenden mRNA durch NMD (engl.: nonsense-mediated decay), und somit zu geringeren Mengen an Produkt führen können (Wagner and Lykke-Andersen, 2002). Die Analyse mittels DNA-Chips ergibt zwar eine grosse Anzahl an Kandidatengen, der Vorteil einer proteomischen Analyse ist aber, dass auch Unterschiede in posttranslationell modifizierten Proteinformen detektiert werden können. Posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung sind oft wichtig für die Proteinfunktion und können erste Hinweise auf den Wirkungsmechanismus des gefundenen Faktors geben. Aus diesem Grund wurde der proteomische Ansatz gewählt.

Gesamtproteinextrakte von parental1 und mut1 wurden mittels 2D-Gelelektrophorese verglichen. Dabei wurden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt, in der zweiten nach ihrer Masse aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde zwischen pH 4 und 7 durchgeführt, SDS-PAGE (engl.: polyacrylamide gelelectrophoresis) wurde zur Massenauffrennung verwendet. Insgesamt wurden vier Analysen in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. **Abb. 4.8** zeigt ein repräsentatives Gel für die beiden Zelllinien.

Die Protein-Spots auf den Gelen wurden per Auge und mit PDQuest, einer Software für die Analyse von Proteingelen, verglichen. Proteine, die in einer Zelllinie mindestens doppelt so intensiv waren als in der anderen, wurden versucht mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) zu identifizieren. Insgesamt erfüllten zehn Spots dieses Kriterium, von der Hälfte konnte die Identität bestimmt werden, bei den anderen schlug die Analyse fehl, wahrscheinlich weil zu wenig Material vorhanden war. Die fünf identifizierten Proteine sind in **Abb. 4.8** mit Pfeilen markiert. Thioredoxin (Nr.1) und zwei Formen von Hsp27 (Nr.3) waren in mut1-Zellen herabreguliert, Cofilin 1 (Nr.2) und Reticulocalbin (Nr.4) hochreguliert.

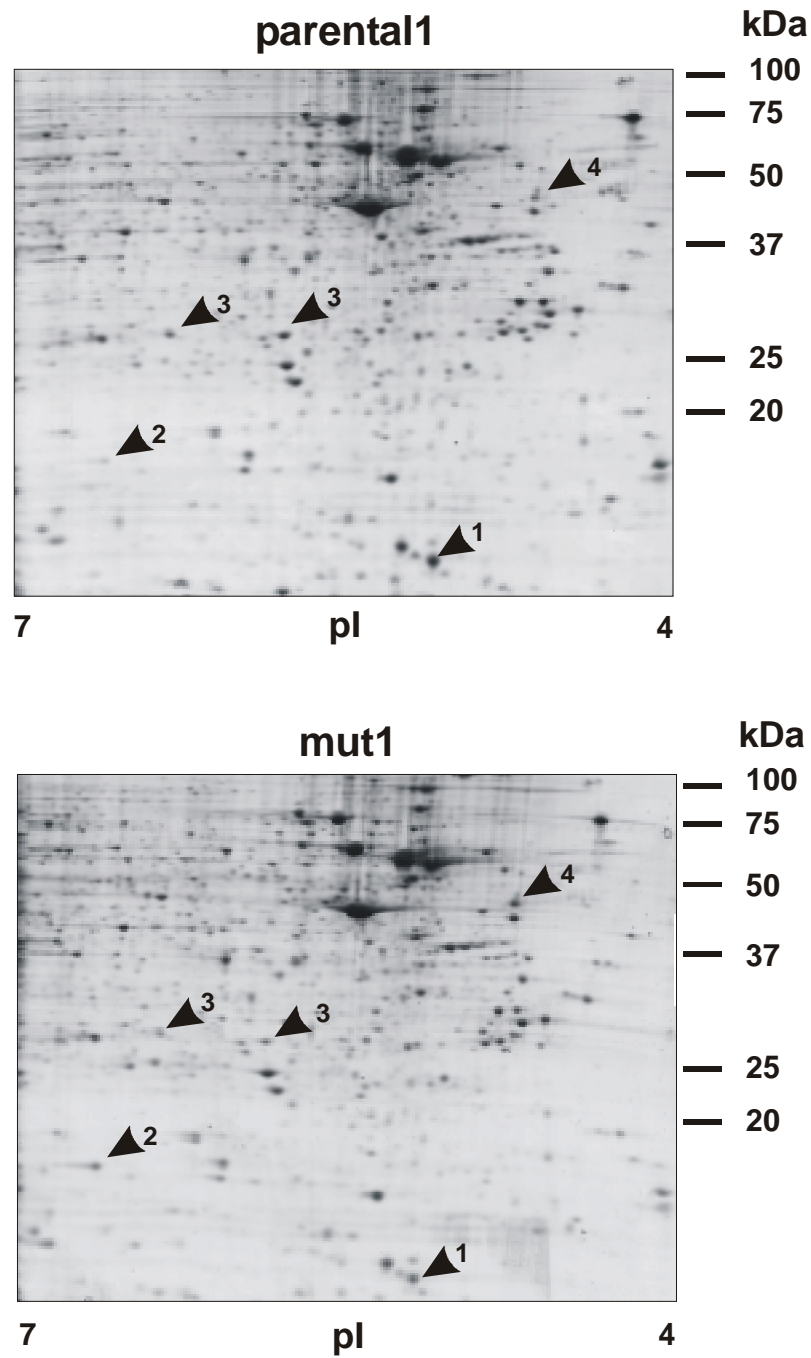


Abb. 4.8: 2D-Gelanalyse von parental1- und mut1-Zelllysaten. Proteine von Gesamt-Zellextrakten wurden in der 1. Dimension mittels IEF, in der 2. mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Unterschiede in den Proteinmengen wurde mit PDQuest ermittelt. Gezeigt sind repräsentative Gele. Spot Nr.1 wurde in der Massenspektroskopie-Analyse als Thioredoxin identifiziert, Nr.2 als Cofilin 1, Nr.3 jeweils als Hsp27 und Nr.4 als Reticulocalbin.

Als nächstes wurde untersucht, ob auch die mRNA dieser Faktoren in mut1 reduziert beziehungsweise vermehrt vorhanden war. Dazu wurden Northern-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA der beiden Zelllinien durchgeführt (**Abb. 4.9**).

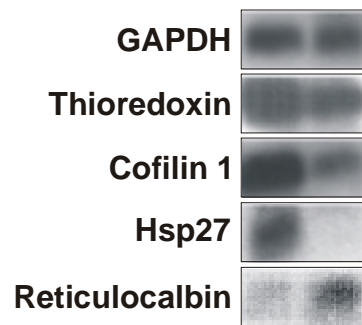


Abb. 4.9: Northernblot-Analyse der differentiell exprimierten Faktoren in parental1 und mut1. RNA wurde aus parental1 (rechts) und mut1 (links) präpariert und die Transkriptionsrate von Thioredoxin, Cofilin 1, Hsp27 und Reticulocalbin auf Northernblots verglichen. Als Kontrolle wurde auch die GAPDH-Mengen bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Blots.

Das Expressionsmuster der Proteine konnte auf RNA-Ebene für alle Faktoren ausser Cofilin 1 bestätigt werden. Für Cofilin 1 ergab sich, dass parental1 Zellen mehr mRNA aber weniger Protein besitzen. Hier stehen 2D-Gel und Northern-Blot also in einem scheinbaren Widerspruch zueinander, auf den in Abschnitt 4.4.1 weiter eingegangen wird.

4.3 Untersuchung der Kandidaten-Proteine auf ihre Rolle in der GR-Signaltransduktion

4.3.1 Thioredoxin ist nicht für die Hormonresistenz der mut1 Zellen verantwortlich

Von Thioredoxin war bereits bekannt, dass es unter gewissen Bedingungen die GR-Funktion beeinflussen kann, deswegen wurde es als erstes untersucht. Thioredoxin ist ein kleines Protein, das als starke Disulfidreduktase fungiert (Holmgren, 1985). Es interagiert direkt oder indirekt mit mehreren Transkriptionsfaktoren, und daher wird vermutet, dass es eine Rolle in der Redoxregulation der Genexpression spielt (Makino et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass Thioredoxin an die DNA-Bindungsdomäne des Glucocorticoidrezeptors bindet (Makino et al., 1999) und dass Thioredoxin-Antisense-Oligonukleotide die GR-Transaktivierung hemmen (Makino et

al., 1996). Ausserdem ist es wichtig für die GR-Funktion unter oxidativem Stress; werden Zellen mit H_2O_2 behandelt, ist die Rezeptorfunktion gestört, was durch Überexpression von Thioredoxin verhindert werden kann (Makino et al., 1996). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die GR-Signaltransduktion von den Thioredoxinmengen in der Zelle abhängig ist. Deswegen wurde hier vermutet, dass die reduzierten Thioredoxinmengen in mut1 für die Inhibition der Hormonantwort verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Thioredoxin-cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Dieser wurde in mut1-Zellen transfiziert und die GR-Transaktivierung in Reporterassays gemessen. Wie in **Abb. 4.10** zu sehen ist, konnten die erhöhten Thioredoxinmengen die reduzierte Hormonantwort von mut1 nicht wiederherstellen. Daraus wurde geschlossen, dass die niedrigere Expression von Thioredoxin nicht für die Hormonresistenz von mut1 verantwortlich ist.

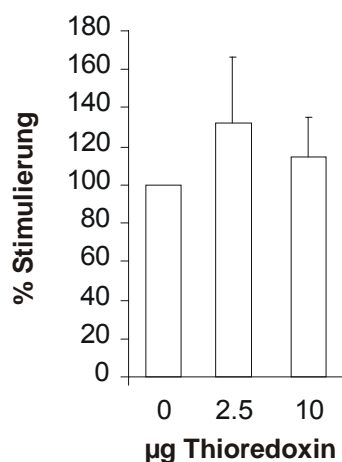


Abb. 4.10: Überexpression von Thioredoxin hat keinen Einfluss auf die GR-Transaktivierung in mut1.

Mut1-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMVβGal und verschiedenen Mengen an entweder pRK5Thio, dem Thioredoxin-Expressionsplasmid, oder dem Klonierungsvektor transfiziert und 16 h mit 1 µM Dex stimuliert. Die Stimulierung mit "leerem" Expressionvektor wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten +SEM.

4.3.2 Hsp27 und Reticulocalbin zeigen keinen Einfluss auf die GR-Signaltransduktion

Hsp27 gehört zur Familie der kleinen Hitzeschock-Proteine und kann als Chaperon fungieren (Jakob et al., 1993). Ausserdem wurde gezeigt, dass es eine Rolle in der Regulierung von Actin-Filamenten spielt. Es ist bekannt, dass es regulatorisch wichtige Phosphorylierungsstellen hat (Gerthoffer and Gunst, 2001). Zum Beispiel führt die Phosphorylierung von Hsp27 zur vermehrten Ausbildung von filamentösem (F-) Actin (Gerthoffer and Gunst, 2001), während die dephosphorylierte Form die Filamentbildung inhibiert (Wieske et al., 2001). Wie im Fall von Thioredoxin war in

parental1 auch mehr Hsp27-Protein vorhanden als in mut1-Zellen. Es wurden sogar zwei Spots im 2D-Gel als Hsp27 identifiziert, die wahrscheinlich verschiedenen phosphorylierten Formen des Proteins entsprechen. Wiederum wurde getestet, ob die Erhöhung des Faktors in mut1 zu einer verbesserten GR-Transaktivierung führt. Es wurden Luziferaseassays mit kotransfiziertem Hsp27 durchgeführt, die in **Abb. 4.11A** gezeigt sind. Auch im Fall von Hsp27 konnte kein Effekt auf die GR-Funktion in mut1-Zellen nachgewiesen werden.

Ähnliches traf auch für Reticulocalbin zu. Bei Reticulocalbin handelt es sich um ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das zur Familie der CREC (Cab45, Reticulocalbin, ERC-45, Calumenin)-Proteine gehört (Yabe et al., 1997). Es wird ausschliesslich im endoplasmatischen Reticulum (ER) exprimiert (Honore and Vorum, 2000); über seine Funktion ist jedoch wenig bekannt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen war Reticulocalbin vermehrt in mut1 vorhanden. Deswegen wurde vermutet, dass die Erhöhung von Reticulocalbin in Wildtyp-Zellen zu einer verringerten GR-Funktion führen könnte. Dies war aber nicht der Fall, wie **Abb. 4.11B** zeigt.

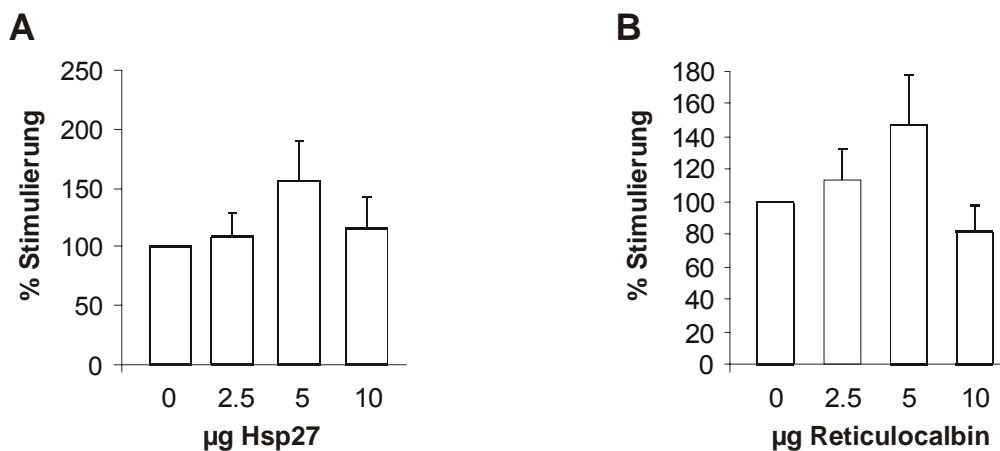


Abb. 4.11: Hsp27 und Reticulocalbin beeinflussen die GR-Transaktivierung nicht. (A) Luziferaseassays in mut1 mit Kotransfektion von Hsp27. Mut1-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMVβGal und verschiedenen Mengen an entweder pRK5Hsp27, dem Hsp27-Expressionsplasmid, oder dem Klonierungsvektor transfiziert und 16 h mit 1 µM Dex stimuliert. Die Stimulierung mit "leerem" Expressionvektor wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten +SEM. **(B)** Luziferaseassays in Wildtypzellen mit kotransfiziertem Reticulocalbin. Die Assays wurden wie in (A) durchgeführt, ausser dass HeLa-Wildtypzellen und das Reticulocalbin-Expressionsplasmid pRK5ret verwendet wurde.

4.3.3 Cofilin 1 inhibiert die GR-Funktion ohne an den Rezeptor zu binden

Cofilin 1 ist bekannt als Actin-regulierender Faktor (Dos Remedios et al., 2003; Moon and Drubin, 1995) und gehört zusammen mit Cofilin 2 und Actin-Depolymerisierungsfaktor (ADF) zur ADF/Cofilin-Familie (Carlier, 1998), einer Proteinfamilie, die von Bakterien bis Säugern hochkonserviert ist (Dos Remedios et al., 2003). Seine Funktion ist gut untersucht: es bindet einerseits an F-Actin, wobei es dessen Konformation verändert und dadurch zur Depolymerisierung und Destabilisierung des F-Actins führt (McGough et al., 1997), andererseits stabilisiert es ebenfalls durch Bindung freies (G-) Aktin (Bamburg and Wiggan, 2002). Eine Funktion im Signalweg des GRs oder eines anderen Transkriptionsfaktors war bislang nicht bekannt. Wie im Fall von Reticulocalbin war mehr Cofilin in mut1 als in parental1 vorhanden, deswegen wurde sein Einfluss auf die GR-Funktion mittels Kotransfektion und Reporterassays erst in Wildtypzellen untersucht (**Abb. 4.12A**). Überexpression von Cofilin führte zu einer Inhibition der GR-Transaktivierung, was in parental1-Zellen und einer anderen humanen Zelllinie, HEK293, bestätigt werden konnte (**Abb. 4.12A** und Daten nicht gezeigt). In mut1-Zellen hingegen hatte eine weitere Erhöhung der Cofilinmengen keinen Einfluss auf die ohnehin schwächere Hormonantwort. Um diesen Befund weiter zu untermauern, wurde eine Zelllinie hergestellt, die Cofilin stabil überexprimiert. Die erhöhten Cofilinmengen in dieser Zelllinie c1 waren im Westernblot nachweisbar (**Abb. 4.12B oben**). Die GR-Aktivität von c1 wurde in Luziferaseassays mit derjenigen von Wildtyp-, parental1- und mut1-Zellen verglichen (**Abb. 4.12B unten**). Dabei stellte sich heraus, dass c1 eine sehr ähnliche Hormonantwort wie mut1 zeigt, die bei jeder getesteten Dex-Konzentration verglichen mit Wildtypzellen und parental1 ungefähr um einen Faktor 5 reduziert war.

Damit war gezeigt, dass Cofilin die GR-Transaktivierung inhibieren kann. Die Frage stellte sich nun, ob diese Inhibition für den GR spezifisch ist, oder ob Cofilin ein allgemeiner Hemmer von Transkriptionsfaktoren ist. Um dies zu klären, wurden AP-1 und NF κ B, zwei andere Transkriptionsfaktoren, untersucht. Es wurden wiederum Reporterassays durchgeführt, das Luziferasegen wurde aber in diesem Fall vom Collagenase-Promotor, der von AP-1 aktiviert wird, beziehungsweise von einem Promotor mit 6 NF κ B-responsiven Elementen getrieben. Beide Faktoren wurden mit dem Phorbolster PMA stimuliert. Wie in **Abb. 4.12C** zu sehen ist, wurde die

Induzierbarkeit dieser beiden Faktoren nicht von transienter Cofilin-Coexpression beeinträchtigt, in c1 war sie sogar höher als in Wildtypzellen.

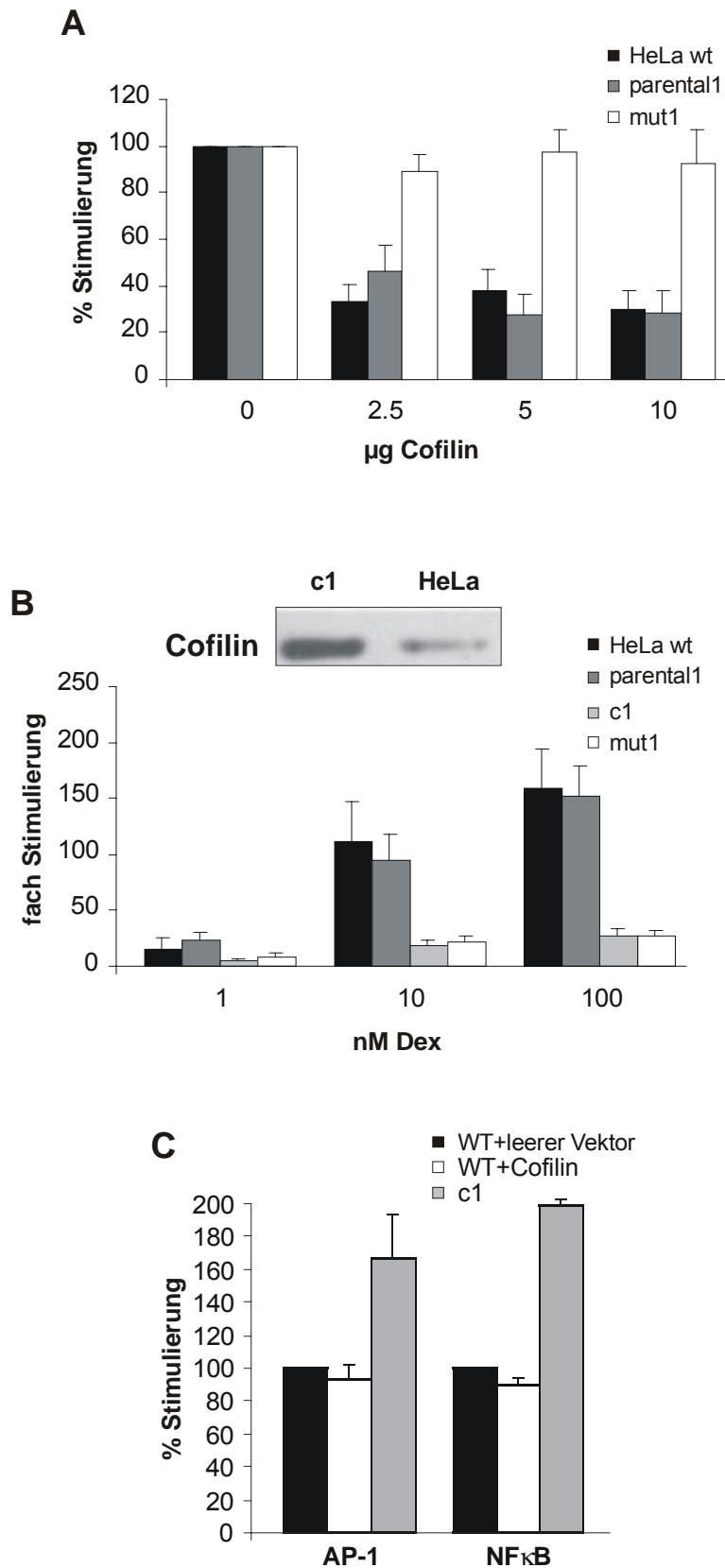


Abb. 4.12: Transiente wie auch stabile Überexpression von Cofilin inhibiert die GR-Transaktivierung spezifisch. (A) Luziferaseassays mit transient transfiziertem Cofilin. Wildtyp-, parental1- und mut1-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMV β Gal und verschiedenen Mengen an pRK5cof, einem Cofilin exprimierendem Plasmid, transfiziert und 24 h mit 1 μ M Dex stimuliert. Die Stimulierung ohne exogenes Cofilin wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Experimenten +SEM. **(B)** Analyse von c1, einer Zelllinie, die Cofilin stabil exprimiert. Die Expression von Cofilin in c1- und Wildtyp-Zellen wurde in Westernblots mit einem Antikörper gegen alle Formen von Cofilin verglichen (oben). Verschiedene Zelllinien wurden mit MTV-luc und pCMV β Gal transfiziert und mit verschiedenen Dex-Konzentrationen für 24 h stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulierung bezogen auf die unstimulierten Werte aus 5 unabhängigen Experimenten. **(C)** Untersuchung der AP-1 und NF κ B. Aktivität. Wildtyp-Zellen wurden mit coll-luc (für AP-1) oder 6xNF κ B-luc, pCMV β Gal und 10 μ g pRK5cof oder leerem Vektor transfiziert, c1 nur mit coll-luc oder 6xNF κ B-luc und pCMV β Gal. Die Zellen wurden für 16 h mit 80 ng/ml PMA stimuliert. Die Stimulierung in Wildtyp-Zellen mit leerem Vektor ist auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten + SEM.

Da der verwendete Screen darauf ausgelegt war, Faktoren zu finden, die die GR-Funktion unabhängig von physikalischer Wechselwirkung mit dem Rezeptor beeinflussen, musste die Frage geklärt werden, ob Cofilin an den GR bindet. Dazu wurden zunächst Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. In HEK293-Zellen wurden entweder Wildtyp-Cofilin zusammen mit GR exprimiert, der mit einem „Flag“-Epitop versehen ist, oder Wildtyp-GR mit Flag-fusioniertem Cofilin. Beim Flag-Epitop handelt es sich um eine Sequenz von acht Aminosäuren, die entweder an den C- oder an den N-Terminus eines Proteins gehängt wird. Das Epitop wird von spezifischen Antikörpern erkannt, die unter anderem bereits an Agarose gekoppelt erhältlich sind. Damit ist es möglich, Flag-fusionierte Proteine zusammen mit ihren Bindungspartnern durch die Antikörperbindung an einer Matrix zu immobilisieren. Bei der Elution wird die Bindung zwischen Antikörpern und Fusionsproteinen gebrochen, und das Eluat kann mittels Westernblot analysiert werden. Flag-fusionierter GR beziehungsweise fusioniertes Cofilin wurden also an eine Agarosematrix gebunden. Nach der Elution wurde im Westernblot versucht, Cofilin beziehungsweise GR nachzuweisen. Als positive Kontrollen wurden Hsp90 als GR-bindendes Protein und Actin als Cofilin-Interaktionspartner detektiert. Es konnte in beiden Fällen keine physikalische Wechselwirkung von Cofilin und GR nachgewiesen werden, während

die positiven Kontrollen eindeutig Interaktionen zeigten (**Abb. 4.13A**). Dies war ein starker Hinweis darauf, dass die inhibitorische Wirkung von Cofilin nicht durch Bindung an den GR zustande kommt. Um dies zu bestätigen, wurden GST-pull-down-Assays gemacht. Das Prinzip dieser Methode ist ähnlich wie das der Co-Immunopräzipitierung, sie ist aber sensitiver und kann daher auch schwache Wechselwirkungen nachweisen. Immobilisiert wurde der GR mittels eines GST (Glutathion-S-Transferase)-Epitops, das an Sepharose-gekoppeltes Glutathion gebunden wurde. Das zugegebene Cofilin war mit ³⁵Schwefel-Methionin markiert. Wiederum wurde in den Eluaten Hsp90 als positive Kontrolle gefunden, radioaktives Cofilin konnte hingegen nicht detektiert werden (**Abb. 4.13B**).

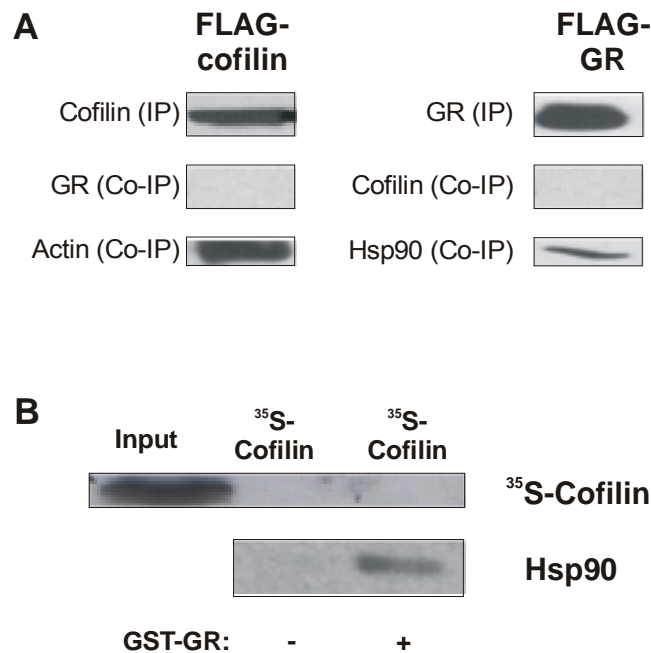


Abb. 4.13: Cofilin bindet nicht an den GR. **(A)** Co-Immunopräzipitierung mit Flag-fusioiertem GR oder Cofilin. HEK-Zellen wurden entweder mit 10 µg Flag-Cofilin oder Flag-GR transfiziert. Nach der Präzipitierung der Flag-fusionierten Proteine wurden Westernblot-Analysen mit Antikörper gegen GR beziehungsweise Cofilin durchgeführt. Als positive Kontrollen wurde Actin bzw. Hsp90 detektiert. Gezeigt sind repräsentative Blots. **(B)** GST-Pull-down-Assays mit GST-GR und markiertem Cofilin. GST-fusionierter GR wurde in Bakterien exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Mit radioaktivem Schwefel markiertes Cofilin wurde zugegeben und die Eluate auf die Anwesenheit von Cofilin oder Hsp90 als positive Kontrolle untersucht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Cofilin als neuer GR-Inhibitor identifiziert wurde. Die Inhibition bedarf keiner physikalischen Wechselwirkung mit dem GR, und da der Effekt unabhängig von der Dex-Konzentration war, ist es unwahrscheinlich, dass Cofilin die Hormonbindung des Rezeptor stört. Natürlich war es nun von Interesse, eine Vorstellung vom Wirkungsmechanismus dieses inhibitorischen Effekts zu bekommen. Im letzten Abschnitt werden Experimente beschrieben, die zur Aufschlüsselung des Mechanismus' beitragen sollten.

4.4 Aufklärung des Wirkungsmechanismus' von Cofilin

4.4.1 Die dephosphorylierte Form von Cofilin ist verantwortlich für dessen inhibitorischen Effekt

Die Actin-Depolymerisierungsfunktion von Cofilin wird durch dessen Phosphorylierung an Serin 3 inhibiert. Das Phosphat an dieser Stelle verhindert durch Ladungsabstossung, dass Cofilin an Actin binden kann (Moriyama et al., 1996). Entsprechend ist eine Mutante, in der Serin 3 durch ein Alanin ersetzt wurde (S3A), konstitutiv aktiv, wohingegen die Substitution dieses Serins durch ein Aspartat (S3D), das die negative Ladung des Phosphatrestes simuliert, zu einer kompletten Inaktivierung von Cofilin führt (Moriyama et al., 1996). Wenn die Actin-Depolymerisierungsfunktion von Cofilin für seine inhibitorische Wirkung auf den GR notwendig ist, sollten diese Mutanten dasselbe Aktivitätsmuster für die GR-Inhibierung aufweisen. Um dies zu testen, wurden diese Cofilinmutanten hergestellt und in Luziferaseassays getestet (**Abb. 4.14**). Dabei zeigte sich, dass S3A die GR-Transaktivierung in ähnlichem Masse hemmt wie Wildtyp-Cofilin, S3D hingegen keinen signifikanten Effekt mehr auf die GR-Funktion hat. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass Actin-Depolymerisierung am inhibitorischen Mechanismus von Cofilin beteiligt ist.

Es ist allerdings auch bekannt, dass die Phosphorylierung von Serin 3 die intrazelluläre Verteilung von Cofilin reguliert. Cofilin liegt mehrheitlich im Cytoplasma vor, ein gewisser Anteil ist aber auch im Kern vorhanden. Dieser Anteil wird massiv erhöht, wenn Serin 3 durch ein Alanin ersetzt wird, das heisst wenn Cofilin nicht

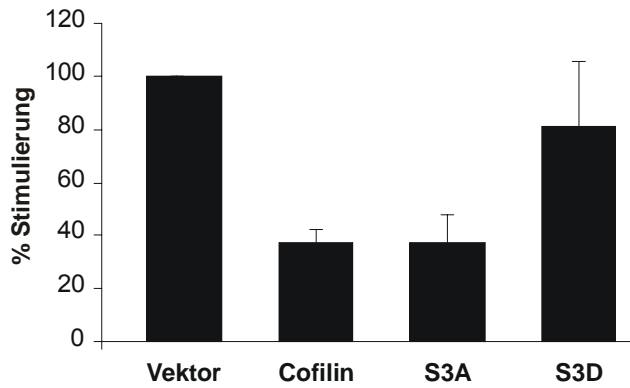


Abb. 4.14: Die GR-Inhibierung durch Cofilin ist abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus. HeLa-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMVβGal und 10 µg leerem Vektor oder wt-, S3A- oder S3D-Cofilin transfiziert und 48 h mit 1 µM Dex stimuliert. Die Stimulierung ohne exogenes

Cofilin wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Experimenten +SEM.

mehr phosphorylierbar ist (Nebl et al., 1996). Um herauszufinden, ob die intrazelluläre Verteilung von Cofilin wichtig ist für seinen Effekt auf den GR, wurde eine weitere Mutante hergestellt, in der das vermutete Kernlokalisierungssignal (Aminosäuren 30-34) deletiert ist (CofΔNL). Die EGFP-fusionierte Form dieser Mutante war tatsächlich fast ausschliesslich cytoplasmatisch, während die Wildtyp-Form in beiden Kompartimenten vorkam (**Abb. 4.15A**).

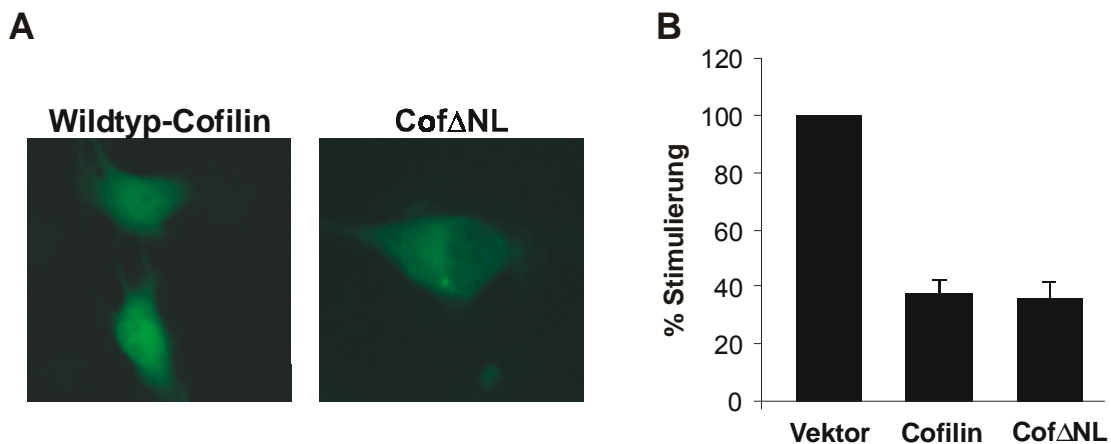


Abb. 4.15: Cofilin muss nicht im Kern anwesend sein, um den GR zu inhibieren. (A) Intrazelluläre Verteilung von Wildtyp-Cofilin und CofΔNL. HeLa-Zellen wurden mit EGFP-fusioniertem Cofilin oder CofΔNL transfiziert und die Verteilung der Proteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(B)** Untersuchung der Wirkung von CofΔNL auf die GR-Transaktivierung. HeLa-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMVβGal und 10 µg leerem Vektor, Wildtyp-Cofilin oder CofΔNL transfiziert und 48 h mit 1 µM Dex stimuliert. Die Stimulierung ohne exogenes Cofilin wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Experimenten +SEM.

Cof Δ NL inhibierte den GR genau so stark wie Wildtyp-Cofilin (**Abb. 4.15B**), woraus geschlossen werden konnte, dass die Anwesenheit von Cofilin im Kern für seinen inhibitorischen Effekt nicht notwendig ist.

Da die Phosphorylierung von Cofilin seine Aktivität reguliert, war auch von Interesse, welche Form von Cofilin in mut1-Zellen erhöht ist. Um dies zu untersuchen, wurde von zwei verschiedenen Antikörpern Gebrauch gemacht, der eine erkennt beide Cofilinformen, der andere ist spezifisch für Phospho-Cofilin. Die Mengen von gesamtem Cofilin und phosphoryliertem Cofilin konnten also mittels Westernblot-Analyse in den verschiedenen Zelllinien verglichen werden (**Abb. 4.16**). Es stellte sich heraus, dass sich die gesamten Cofilinmengen in Wildtyp-, parental1- und mut1-Zellen nicht wesentlich unterscheiden, in mut1 aber weniger Phospho-Cofilin vorhanden ist als in den anderen beiden Zelllinien. Leider ist es nicht möglich, die dephosphorylierte Form direkt nachzuweisen, da es keinen spezifischen Antikörper gibt; es wurde aber aus diesen Westernblots geschlossen, dass sie in mut1 erhöht sein muss, um die ähnlichen Mengen an Gesamtcofilin zu erklären. Daraus wurde auch gefolgert, dass der Spot im 2D-Gel, der als Cofilin identifiziert wurde, der



Abb. 4.16: Mut1-Zellen enthalten weniger phosphoryliertes Cofilin und daher mehr von der dephosphorylierten Form. Zellextrakte von Wildtyp-, parental1- und mut1-Zellen wurden mittels Westernblot bezüglich ihres totalen Cofilingehalts (oben) und ihres Phospho-Cofilingehalts (unten) analysiert. Gezeigt sind repräsentative Blots.

dephosphorylierten Form entsprechen muss. Teilweise ist damit auch erklärt, warum die Ergebnisse von 2D-Gel und Northernblot bezüglich Cofilin nicht übereinstimmen. Da die gesamten Proteinmengen vergleichbar sind, wären gleiche Mengen an mRNA in der mutierten und der parentalen Zelllinie zu erwarten, wenn die Stabilität der

mRNA und des Protein ähnlich ist. Für Cofilin trifft dies, wie für einige andere Faktoren, aber nicht zu.

Zusammengefasst geht aus diesen Beobachtungen hervor, dass Cofilin in der dephosphorylierten Form, aber nicht im Kern vorliegen muss, um den GR zu inhibieren.

4.4.2 Cofilin erhöht die GR-Fraktion im Kern

Da Cofilin in seiner dephosphorylierten Form sowohl Actin und damit das Actincytoskelett depolymerisiert, als auch GR inhibiert, lag der Schluss nahe, dass das Actincytoskelett in die Hemmung der GR-Funktion involviert sein könnte. Wie in der Einleitung erwähnt, wurde beschrieben, dass das Cytoskelett wichtig für den Transport des Rezeptors in den Kern ist. Es stellte sich daher die Frage, ob Überexpression von Cofilin die Verteilung des GRs in der Zelle verändert. Zuerst sollte bestätigt werden, dass erhöhte Cofilinmengen tatsächlich zur Zerstörung von Actin-Filamenten führt. Dazu wurde das Actin-Cytoskelett mit TRIC (Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat)-fusioniertem Phalloidin gefärbt, einer Chemikalie, die an F-Actin, nicht aber an G-Actin bindet. Durch die rote Fluoreszenz von TRIC konnten die Actin-Filamente in einem konfokalen Lasermikroskop visualisiert werden. Dabei wurde tatsächlich eine starke Beeinträchtigung des Actin-Cytoskeletts durch Cofilin beobachtet (**Abb. 4.17A**).

Um die intrazelluläre Verteilung des GRs zu untersuchen, wurde er mit GFP fusioniert. Die Verteilung des Rezeptors in der Zelle ist damit leicht unter einem Fluoreszenzmikroskop nachzuprüfen. Ausgewertet wurde die GR-Verteilung durch Einteilung der Zellen in 5 Kategorien: GR ausschliesslich cytoplasmatisch, mehrheitlich cytoplasmatisch, gleichverteilt, mehrheitlich nukleär oder ausschliesslich nukleär. Alternativ wurden in Lasermikroskopbildern die Pixeldichte im Cytoplasma und Kern gemessen und der Quotient gebildet. Da die beiden Methoden zu ähnlichen Ergebnissen führten, wurde letztere Methode danach nicht mehr angewandt. Co-Expression von Cofilin mit dem GFP-GR bewirkte, dass dieser in der Abwesenheit von Dex vermehrt im Kern zu finden war, während er sich ohne exogenem Cofilin fast ausschliesslich im Cytosol befand (**Abb. 4.17B**). Nach 5 minütiger Hormonexposition war immer noch ein kleiner Unterschied zwischen Zellen mit transfiziertem Cofilin und solchen mit Kontrollvektor vorhanden, der dann aber nach 10 min verschwand. Daraus wurde geschlossen, dass Cofilin keinen Einfluss

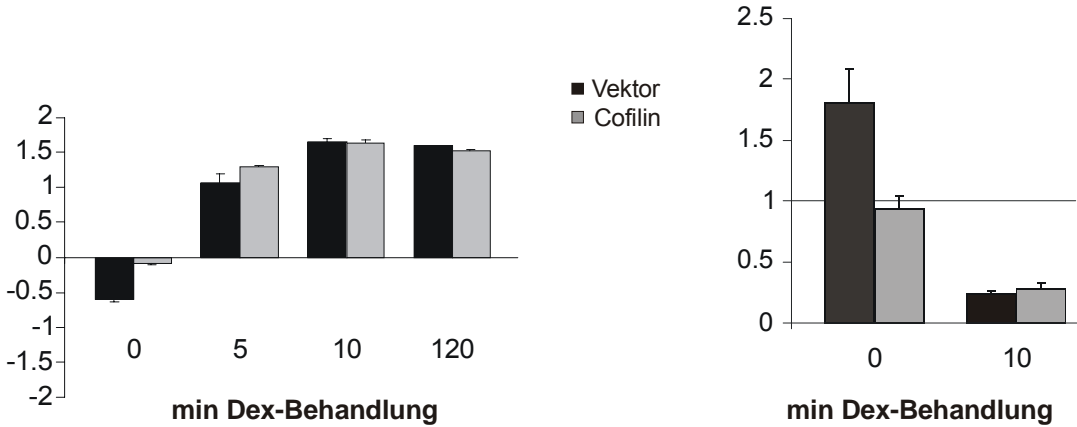
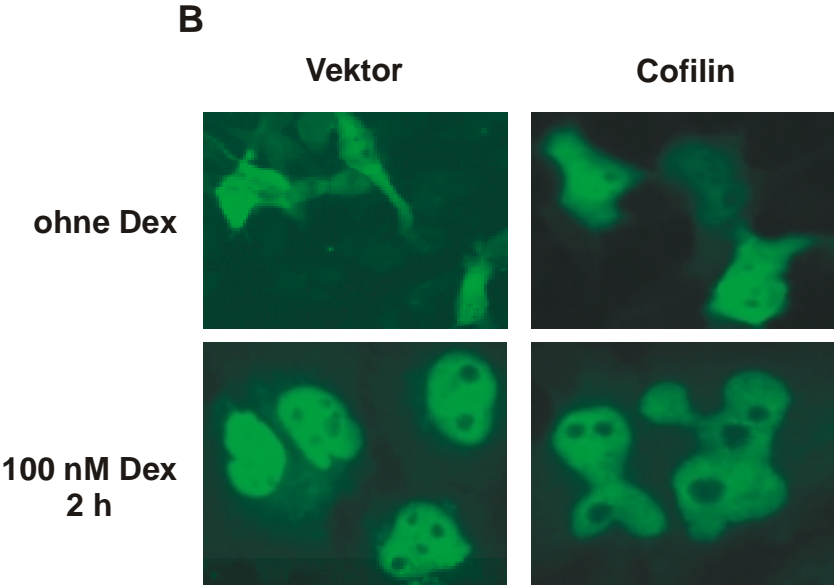
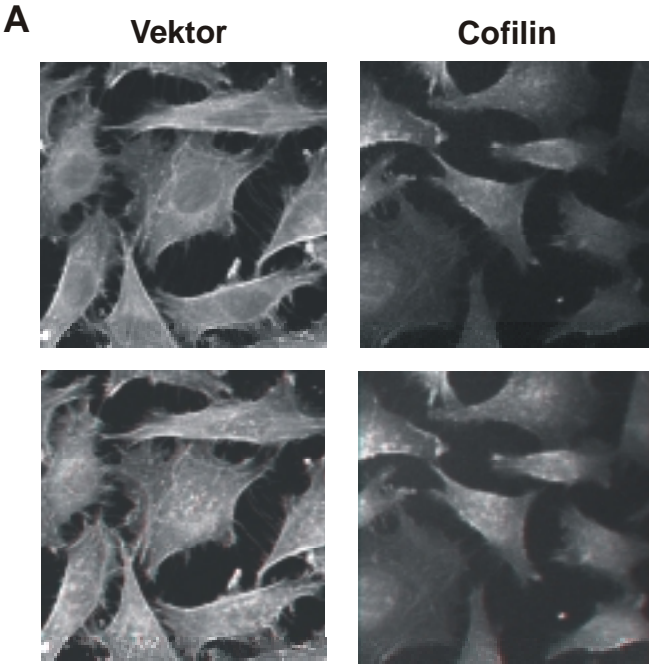


Abb. 4.17: Cofilin bewirkt die Akkumulierung von GR im Kern in Abwesenheit von Hormon. (A) Wirkung von Cofilin auf das Actin-Cytoskelett. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsvektor oder pRK5cof transfiziert, 24 h später fixiert und die Actin-Filamente mit TRIC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Die Bilder wurden durch ein konfokales Lasermikroskop aufgenommen; oben ist eine Querschnittsaufnahme zu sehen, unten ein 3D-Bild (rot-grün 3D-Brille benutzen). **(B)** Einfluss von Cofilin auf die GR-Verteilung vor und nach Hormongabe. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsvektor oder pRK5cof zusammen mit GFP-GR transfiziert und 24 h später für verschiedene Zeiträume mit 100 nM Dex stimuliert. Die GR-Verteilung wurde ermittelt, indem mehr als 100 Zellen pro Zustand auf einer Skala von -2 (GR ausschliesslich im Cytoplasma) bis +2 (GR ausschliesslich im Kern) bewertet wurden (oben). Alternativ wurden in konfokalen Lasermikroskopbilder die Pixeldichte im Cytoplasma und im Kern ermittelt und der Quotient der Werte gebildet (unten).

auf die Translokation des Rezeptors nach Dex-Bindung hat, sondern die subzelluläre Verteilung von GR vor Hormongabe verändert.

Dieser Befund konnte in den c1-Zellen, die Cofilin stabil exprimieren, bestätigt werden (**Abb. 4.18**). Ausserdem wurde auch in der mut1-Zelllinie vor Hormongabe vermehrt GR im Kern gefunden, nach 10 minütiger Hormonexposition hingegen wurden keine Unterschiede mehr zu Wildtypzellen detektiert (**Abb. 4.18**).

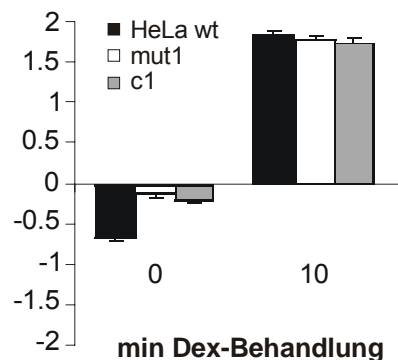


Abb. 4.18: GR akkumuliert im Kern von mut1- und c1-Zellen vor Hormongabe. HeLa-, mut1- und c1-Zellen wurden mit GFP-GR transfiziert und 24 h später für 10 min mit 100 nM Dex stimuliert. Die GR-Verteilung wurde wie in Abb. 17B ermittelt.

4.4.3 Sowohl die Zerstörung der Actin-Filamente als auch die Erhöhung von G-Actin inhibiert die GR-Funktion

Nachdem nun einige Befunde darauf hinwiesen, dass Actin-Depolymerisierung für die GR-Inhibition durch Cofilin notwendig ist, wurde dieser Frage direkter auf den

Grund gegangen. Dazu wurde von Cytochalasin B Gebrauch gemacht, einer Chemikalie, die das Actin-Cytoskelett zerstört (Yahara et al., 1982). Es war bereits bekannt, dass Cytochalasin B in Retinazellen von Hühnerembryonen zur Inhibierung von GR führt (Oren et al., 1999). Dieser Befund konnte hier in HEK293-Zellen bestätigt werden (**Abb. 4.19A**).

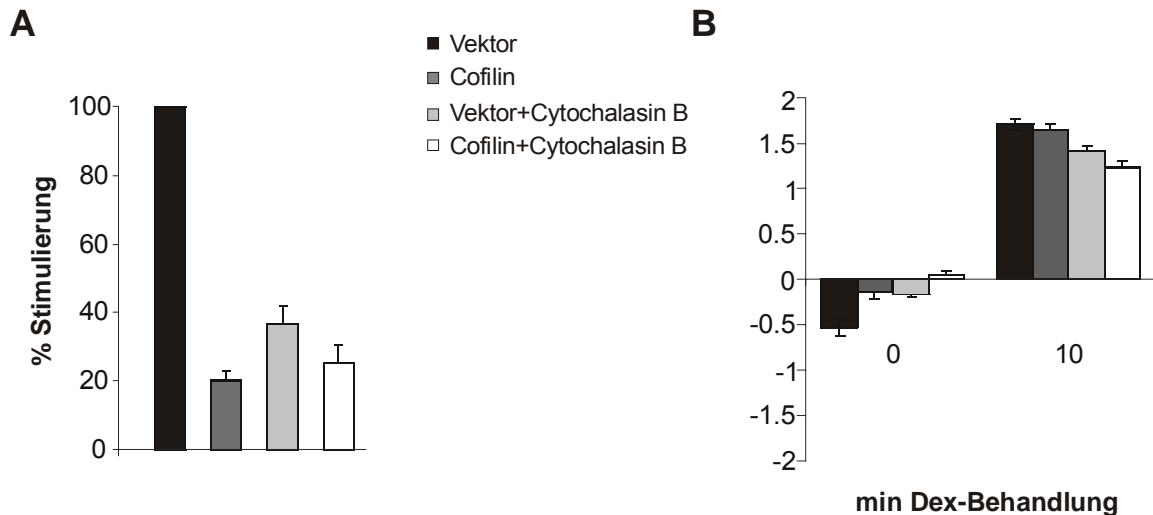


Abb. 4.19: Zerstörung des Actin-Cytoskeletts reduziert die GR-Funktion. (A) Wirkung von Cytochalasin B auf die transkriptionelle Aktivität des GR. HEK-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMV β Gal und 10 μ g Kontrollvektor oder pRK5cof transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen 1 h mit 50 μ g/ml Cytochalasin B vorbehandelt und dann mit 1 μ M Dex für weitere 24 h in Anwesenheit von Cytochalasin B stimuliert. Die Stimulierung mit Kontrollvektor ohne Chemikalie wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Experimenten +SEM. **(B)** Wirkung von Cytochalasin B auf die intrazelluläre Verteilung des GR. HeLa-Zellen wurden mit Kontrollvektor oder pRK5cof zusammen mit GFP-GR transfiziert, 24 h später für eine Stunde mit 50 μ g/ml Cytochalasin B behandelt und danach 10 min mit Dex stimuliert. Ausgewertet wurde wie in Abb. 4.17 beschrieben.

In HeLa-Zellen konnten keine aussagekräftige Reporterassays durchgeführt werden, weil Cytochalasin B in dieser Zelllinie die Transkriptionsrate generell stark inhibierte. Auch die intrazelluläre Rezeptorverteilung wurde vor Hormongabe durch Cytochalasin B ähnlich verändert wie durch Cofilin (**Abb. 19B**). Ausserdem war der Einfluss von Cofilin auf die GR-Verteilung nach Behandlung mit Cytochalasin B drastisch reduziert und hatte keinen signifikanten Effekt mehr auf die GR-

Transaktivierung. Dies legt die Vermutung nahe, dass Cytochalasin B den Effekt von Cofilin simuliert, so dass zusätzliches Cofilin einen viel schwächeren Einfluss auf den GR hat.

Wenn das Actin-Cytoskelett zerstört wird, wird nicht nur der Anteil an F-Actin verringert, sondern auch derjenige von G-Actin erhöht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Erhöhung von G-Actin die Funktion des SRF (engl.: serum response factor), eines anderen Transkriptionsfaktors, inhibiert (Posern et al., 2002). Deswegen sollte untersucht werden, ob ein erhöhter G-Actinanteil auch die GR-Funktion beeinträchtigt. Dazu wurde Wildtyp-Actin und eine Actinmutante, die nicht polymerisieren kann (G13R, (Posern et al., 2002)) in Luziferaseassays eingesetzt. Erhöhte Expression von Actin und insbesondere der Actinmutante führte zu einer reduzierten GR-Transaktivierung (**Abb. 4.20A**). Ausserdem wurde mit beiden Formen erneut das Phänomen beobachtet, dass der GR hormonunabhängig in den Kern translozierte (**Abb. 4.20B**).

All diese Befunde passen zur Hypothese, dass Cofilin durch seine Actin-Depolymerisierungsfunktion den GR inhibiert.

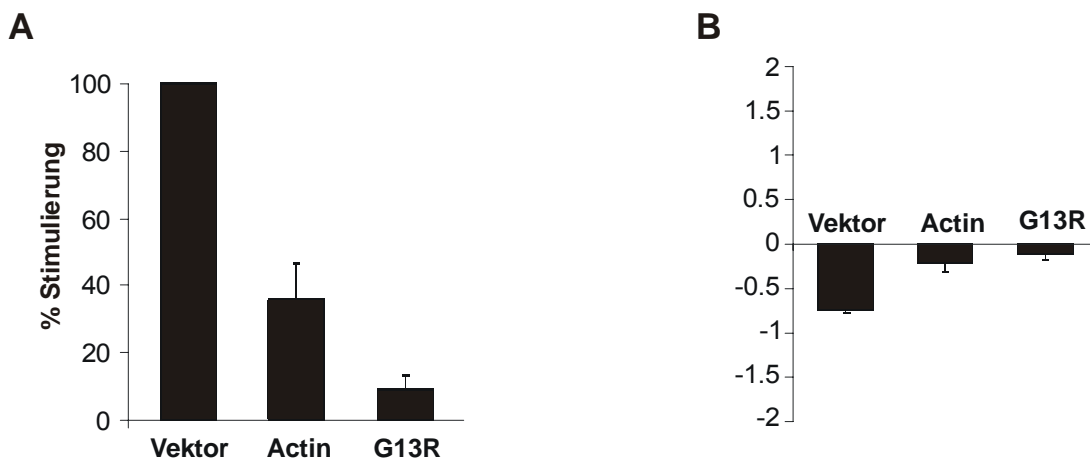


Abb. 4.20: Expression von Wildtyp-Actin oder der Mutante G13R beeinflusst die GR-Funktion wie Cofilin. (A) GR-Transaktivierung nach Überexpression von Wildtyp-Actin oder der Mutante G13R. HEK-Zellen wurden mit MTV-luc, pCMV β Gal und 10 μ g Kontrollvektor, pRK5actin oder pRK5G13R transfiziert und 48 h mit 1 μ M Dex behandelt. Die Stimulierung mit Kontrollvektor wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 Experimenten +SEM. **(B)** Intrazelluläre Verteilung des Rezeptors in Anwesenheit von Wildtyp- oder mutiertem Actin. HeLa-Zellen wurden mit Kontrollvektor, pRK5Actin oder pRK5G13R zusammen mit GFP-GR transfiziert und nach 24 h fixiert und ausgewertet.

4.4.4 Erhöhung von freiem Actin induziert die Expression von c-Jun, einem GR-Inhibitor

Nachdem gezeigt war, dass erhöhte G-Actinmengen den GR inhibieren, stellte sich die Frage nach dem Mechanismus. Aus der Literatur war bekannt, dass die chemische Zerstörung des Actin-Cytoskeletts die Expression von c-Jun, einem bekannten GR-Inhibitor (Schule et al., 1990), induziert (Oren et al., 1999). Es wurde nun vermutet, dass die Überexpression von Cofilin einen ähnlichen Effekt zeigt. Dies wurde mittels Westernblotanalyse bestätigt, denn sowohl transiente wie auch stabile Cofilin-Expression induzierten c-Jun (**Abb. 4.21A**). Ein ähnlicher Anstieg der c-Jun-Menge konnte ausserdem beobachtet werden, wenn Wildtyp-Actin oder die Actinmutante G13R überexprimiert wurden (**Abb. 4.21B**). Dies liess darauf schliessen, dass Cofilin (wie auch Cytochalasin B) die GR-Funktion inhibiert, indem durch die Erhöhung des freien Actins der GR-Inhibitor c-Jun induziert wird.

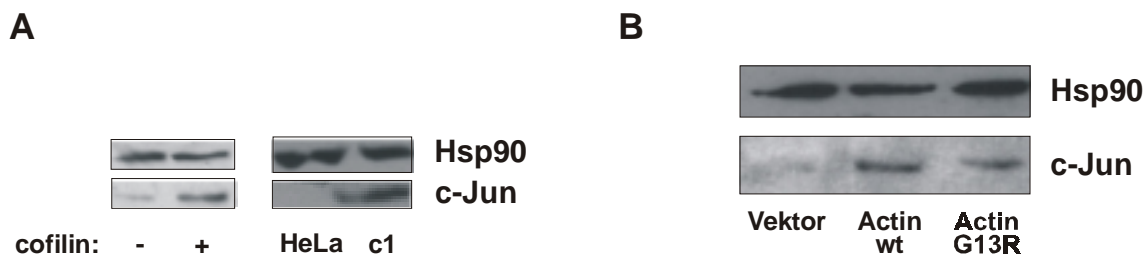


Abb. 4.21: Der GR-Inhibitor c-Jun wird durch erhöhtes G-Actin induziert. (A) Wirkung von transienter und stabiler Überexpression von Cofilin auf c-Jun-Proteinmengen. HeLa-Zellen wurden mit Kontrollvektor oder pRK5cof transfiziert und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels Westernblotanalyse verglichen. Hsp90 diente als Ladungskontrolle. **(B)** Wirkung von Actin und der nicht polymerisierenden Mutante G13R auf die Induktion von c-Jun. HeLa-Zellen wurden mit Kontrollvektor, Wildtyp-Actin oder G13R transfiziert, lysiert und mittels Westernblot auf die c-Jun-Mengen untersucht.

5. Diskussion

5.1 Die Anwendung eines funktionellen Screens zur Suche von Regulatoren der GR-Funktion

Die Glucocorticoide übernehmen vitale Aufgaben im Körper. Ihre Effekte werden durch den Mineralocorticoid- und den Glucocorticoidrezeptor vermittelt. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren (Mangelsdorf et al., 1995), unterscheiden sich aber durch ihre Hormonaffinität (Trapp and Holsboer, 1996). MR hat eine hohe Affinität zu GCs, der GR hingegen wird erst aktiviert, wenn durch sogenannte Stressoren die Hormonspiegel erhöht werden (Trapp and Holsboer, 1996). GC-Resistenz ist ein Phänomen, das in vielen Krankheiten, z.B. in depressiven Störungen, eine wichtige Rolle spielt und wird einer Fehlfunktion des GRs zugeschrieben (Schaaf and Cidlowski, 2003b). In einigen Fällen ist eine Mutation im GR selbst die Ursache für GC-Resistenz (Kino and Chrousos, 2001), sie kann aber auch durch Defekte in der Signaltransduktion des GR entstehen, insbesondere durch die Fehlfunktion von GR-Regulatoren (Schaaf and Cidlowski, 2003b; Scammell et al., 2001). In den letzten Jahrzehnten wurde viel dazu beigetragen, die Signaltransduktion des GRs von der Hormonbindung im Cytosol bis zur DNA-Transkription im Kern zu entschlüsseln; nach wie vor erscheint das Bild jedoch unvollständig.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis des GR-Signalwegs zu leisten. Dies sollte mit einem funktionellen Screen erreicht werden, der Faktoren identifizieren kann, welche an der GR-Funktion beteiligt sind. In zahlreichen Projekten wurde schon nach solchen Faktoren gesucht; die meisten Ansätze basierten jedoch auf physikalischer Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und

dem gesuchten Protein. Auch einige funktionelle Screens sind bekannt, wobei in den meisten – wie in der vorliegenden Studie – mit hormonresistenten Zellen gearbeitet wurde (Grove et al., 1980; Harrison et al., 1995; Lee et al., 1995; Rabindran et al., 1987). Zur Identifikation von neuen GR-regulierenden Faktoren kam es allerdings nur in einer Arbeit, in der Hefestämme analysiert wurden, die durch zufällige Mutagenese hormonresponsiver geworden waren (Sitcheran et al., 2000). Das Potential von funktionellen Screens war also noch nicht ausgeschöpft.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Methode adaptiert, die noch nie für den GR angewandt worden war, aber Erfolge bei der Aufklärung des Interleukin-1-Rezeptor-Signalwegs erzielte (Li et al., 1999). Es wurden Zellen hergestellt, die hormonabhängig die Thymidinkinase des Herpesvirus exprimierten, welche Ganciclovir in ein zytotoxisches Nucleosidanalogen umwandelt. Durch zufällige Mutagenese mit ICR191 oder ENU und Selektion in Dex- und Ganciclovir-haltigem Medium konnten hormonresistente Klone isoliert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass insbesondere die Leserasterverschiebung verursachende Agens ICR191 in der Regel zu GR-Mutationen mit einem ausgeprägten Phänotypen bis hin zur totalen Hormonresistenz führt. Diese Mutanten würden auch unter harschen Selektionsbedingungen gefunden werden. Mutationen in Coregulatoren sollten dagegen in der Regel nur zu einer partiellen Hormonresistenz führen; die entsprechenden Zellen würden eine harsche Selektion nicht überleben. Unter mildereren Bedingungen wird also die Wahrscheinlichkeit erhöht, auch Cofaktor-Mutationen zu finden. Weil das Interesse an solchen Mutationen grösser war, wurden relativ milde Selektionsbedingungen gewählt. Damit wurde in Kauf genommen, dass auch die Anzahl der falsch positiven Klone erhöht wird. Rund die Hälfte der isolierten Zelllinien war in der Tat falsch positiv. Dennoch konnten drei Klone, mut1-3, isoliert werden, die durch eine Mutation in trans (weder im Selektionsmarker- noch im

Rezeptorgen) weniger hormonresponsiv sind. Die Zelllinie mit der ausgeprägtesten GR-Resistenz (mut1) wurde dann verwendet, um Kandidaten für GR-Regulatoren zu identifizieren.

Um die mut1-Zellen zu analysieren, wurde das Proteinexpressionsmuster zwischen den mutierten und der parentalen Zelllinie mittels 2D-Gelelektrophorese verglichen, und anschliessend die Identitäten der differentiell exprimierte Proteine mittels Massenspektrometrie bestimmt. Im Gegensatz zur Analyse mit Microarrays, mit der das Transkriptionsmuster der mRNAs verglichen wird, ergibt der gewählte proteomische Ansatz in der Regel weniger Kandidatenproteine als eine Microarray-Analyse. Der Vorteil ist jedoch, dass zwischen verschiedenen Proteinformen, z.B. phosphoryliert versus unphosphoryliert, unterschieden werden kann. Ausserdem reflektiert das Transkriptionsmuster von Genen nicht unbedingt das Proteinmuster, da die Translation und die Stabilität der Proteine verschieden reguliert sein können. Wie sich herausstellte, waren diese beiden Punkte entscheidend für die Identifizierung von Cofilin 1 als GR-Inhibitor; erstens war nur die dephosphorylierte Form von Cofilin in mut1 hochreguliert, zweitens waren die mRNA-Mengen in den mutierten Zellen sogar geringer als in den parentalen. In einer Microarray-Analyse wäre Cofilin demnach eher nicht als GR-Inhibitor identifiziert worden.

Durch die Analyse von mut1 konnten vier Kandidatenproteine identifiziert werden, Thioredoxin, Hsp27, Reticulocalbin und Cofilin 1. Von Thioredoxin war bereits bekannt, dass es unter bestimmten Bedingungen einen Einfluss auf die GR-Funktion hat, die anderen Proteine waren noch nie in Zusammenhang mit dem GR gebracht worden. Überexpression von Thioredoxin kann die in Zellen nach oxidativem Stress verringerte GR-Aktivität wieder normalisieren (Makino et al., 1996). Mut1-Zellen zeigten eine reduzierte Thioredoxin-Expression. Obwohl sie keinem oxidativen Stress ausgesetzt worden waren, lag der Schluss nahe, dass die verminderte

Thioredoxin-Expression der Grund für die Hormonresistenz sein könnte. Überexpression von Thioredoxin in mut1 führte jedoch zu keiner Verbesserung der Hormonantwort. Somit musste eine andere Veränderung für die Hormonresistenz von mut1 verantwortlich sein. Die Untersuchung der drei anderen Kandidaten ergab, dass Hsp27 und Reticulocalbin ebenfalls keinen Einfluss auf die GR-Funktion hatten, Cofilin 1 konnte hingegen als neuer GR-Inhibitor etabliert werden. Dieser Befund wird im nächsten Abschnitt im Detail diskutiert.

Zusammenfassend wurde die Idee, durch einen funktionellen Screen GR-regulierende Faktoren zu finden, in dieser Arbeit erfolgreich verwirklicht. Ausgehend von der parental1-Zelllinie konnten mit zufallsverteilter Mutagenese und geeigneter Selektion hormonresistente Zellen isoliert werden, deren Analyse Cofilin 1 als einen neuen GR-Inhibitor hervorbrachte. Es ist zu sagen, dass generell nur wenige Klone isoliert, und somit auch wenige Kandidatengene identifiziert werden konnten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Aufklärung des inhibitorischen Wirkungsmechanismus' von Cofilin prioritär behandelt wurde, und deswegen nicht mehr Zeit in die aufwändige Mutation und Selektion der Zellen investiert wurde. Mit der Ausgangszelllinie parental1 wurde aber eine Grundlage für weitere Screens geschaffen, in denen sich z.B. die Selektionsbedingungen oder auch die Methode zur Analyse der hormonresistenten Zellen variieren lassen.

5.2 Cofilin 1 ist ein neuer Inhibitor der GR-Funktion

Cofilin 1 ist ein bekannter Actin-Depolymerisierungsfaktor, und als solcher für die Regulation von Actin-„Treadmilling“ wichtig, einem Prozess, bei dem ATP-gebundene Actin-Monomere (G-Actin) an das Plus-Ende von Actinfilamenten (F-Actin) binden, während ADP-Actin-Untereinheiten vom Minus-Ende dissoziieren,

nachdem das gebundene ATP hydrolysiert wurde (Dos Remedios et al., 2003) (**Abb. 5.1**).

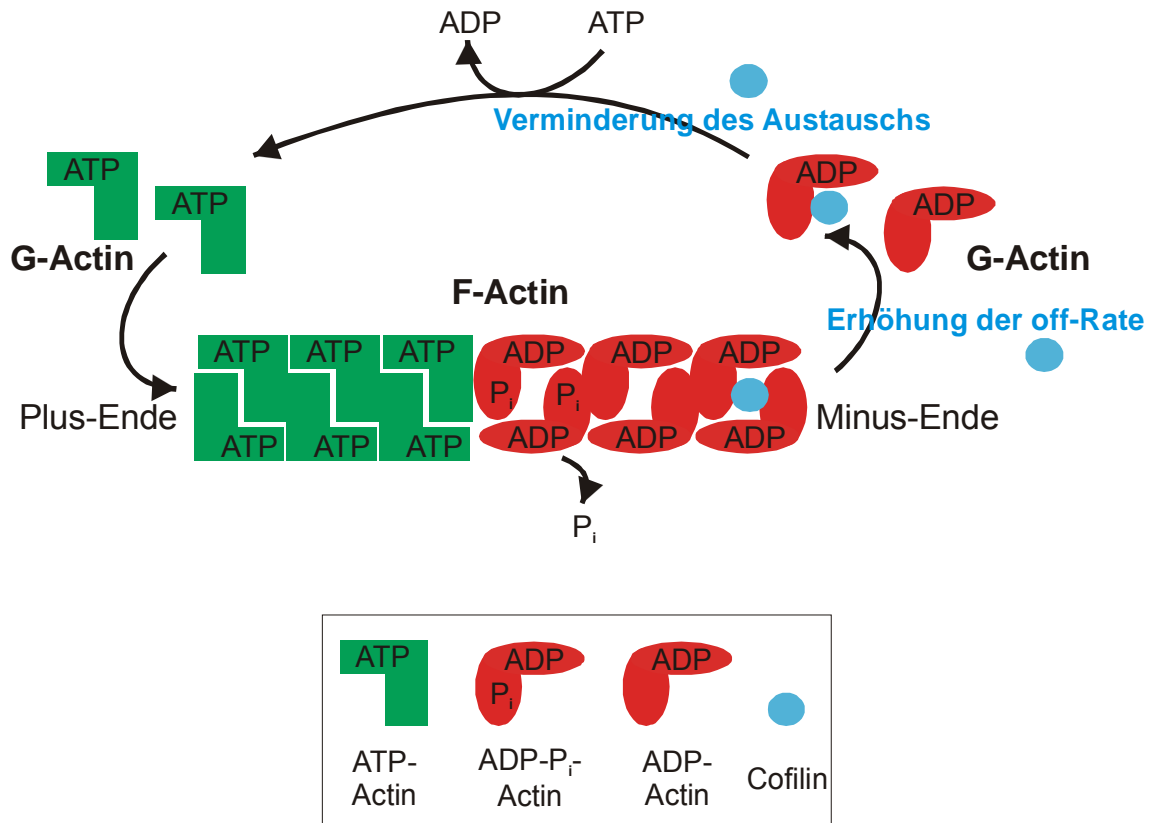


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des "Treadmilling" von Actin. ATP-Actin wird an das Plus-Ende gebunden, während ADP-Actin vom Minus-Ende dissoziiert. Cofilin bindet ADP-Actin, was zur Erhöhung der off-Rate und der Verminderung des ADP-ATP-Austauschs führt.

Im Fließgleichgewicht bleibt das Filament gleichlang, obwohl ein ständiger Austausch von Molekülen stattfindet. Cofilin verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des G-Actins, indem es an ADP-Actin bindet und damit einerseits F-Actin destabilisieren und die Dissoziationsrate am Minus-Ende erhöht, andererseits G-Actin in seiner ADP-gebundenen Form stabilisiert und so den Austausch von ADP mit ATP und damit die Addition von Actin-Monomeren an Filamente verhindert (Bamburg and Wiggan, 2002). In dieser Funktion ist es wichtig in Prozessen wie Zellmotilität, Zellteilung, Organisation der Membranen und Neuronenwachstum (Dos Remedios et al., 2003). Obwohl Cofilin 1 ein gut untersuchtes Protein ist, wurde es

noch nie in Zusammenhang mit der GR-Funktion oder der eines anderen nukleären Rezeptors gebracht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die transiente als auch die stabile Überexpression von Cofilin die GR-Transaktivierung in verschiedenen Zelltypen inhibiert. Hingegen wurde die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 nicht gehemmt, was zeigt, dass Cofilin nicht ein unspezifischer Transkriptionsinhibitor ist.

Zwei Befunde zeigten, dass Cofilin für seine inhibitorische Wirkung auf den GR die Actin-Depolymerisierungsfunktion braucht. Erstens wurden Cofilin-Mutanten untersucht, die bezüglich der Actin-Depolymerisierung entweder konstitutiv aktiv (Mutante S3A) oder inaktiv (Mutante S3D) waren (Moriyama et al., 1996). Bezüglich der GR-Funktion verhielt sich die konstitutiv aktive Mutante ähnlich wie Wildtypcofilin, die inaktive zeigte hingegen keine inhibitorische Wirkung mehr. Zweitens zeigten Westernblotanalysen, dass auch in der mutierten Zelllinie mut1 die dephosphorylierte Form von Cofilin höher exprimiert war als in parental1. Daraus konnte ausserdem geschlossen werden, dass es sich bei dem als Cofilin identifizierten Spot auf dem 2D-Gel um die dephosphorylierte Form handeln muss. Eine offene Frage bleibt, warum die phosphorylierte Form auf den 2D-Gelen nicht gefunden werden kann. Eine Möglichkeit wäre, dass die Mengen unter der Detektionsgrenze liegen, eine andere, dass der sichtbare Spot in mut1 der dephosphorylierten, derjenige in parental1 der phosphorylierten Form entspricht. Tatsächlich wurde bei einigen, allerdings nicht bei allen Gelen gefunden, dass der Spot auf mut1-Gelen leicht ins basische verschoben war.

Die Hypothese, dass der Abbau von Actin-Filamenten eine Rolle für die GR-Inhibierung spielt, konnte mit Experimenten weiter untermauert werden, in denen das Actin-Cytoskelett mit Cytochalasin B zerstört wurde. Die Behandlung der Zellen mit diesem Agens inhibierte den GR ebenfalls, was in Retinazellen von Hühnerembryonen schon gezeigt worden war (Oren et al., 1999), ausserdem hatte Cofilin in Gegenwart von Cytochalasin B keine Wirkung auf die GR-Transaktivierung mehr. Cytochalasin B und Cofilin scheinen also den GR durch einen ähnlichen Mechanismus zu inhibieren.

Da Cofilin sowohl F-Actin abbaut wie auch G-Actin stabilisiert (Bamburg and Wiggan, 2002), könnten fehlende Actin-Filamente wie auch die Erhöhung des freien Actins in die GR-Inhibierung verwickelt sein. Überexpression von Wildtyp-Actin (Erhöhung der freien wie der filamentösen Form) und insbesondere von der nicht polymerisierenden

Mutante G13R (Erhöhung von G-Actin) führte ebenfalls zur Inhibierung von GR. Das liess darauf schliessen, dass die Erhöhung des G-Actinanteils (z.B. durch Cofilin oder Cytochalasin B) einen Prozess auslöst, der schliesslich zu einer gestörten GR-Funktion führt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch schon für den Transkriptionsfaktor SRF (engl.: serum response factor) vorgeschlagen (Posem et al., 2002).

In einer früheren Studie wurde beschrieben, dass Cytochalasin B den GR inhibiert, indem es den etablierten GR-Inhibitor c-Jun induziert (Oren et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Überexpression von Cofilin (transient und stabil) sowie von Wildtyp- und mutiertem Actin ebenfalls zur Induktion von c-Jun führt. Daraus leitet sich folgendes Modell für den inhibitorischen Mechanismus von Cofilin ab (**Abb. 5.2**): die Actindepolymerisierung führt zur Erhöhung des G-Actinanteils in der Zelle, was seinerseits über noch nicht bekannte Schritte den etablierten GR-Inhibitor c-Jun induziert.

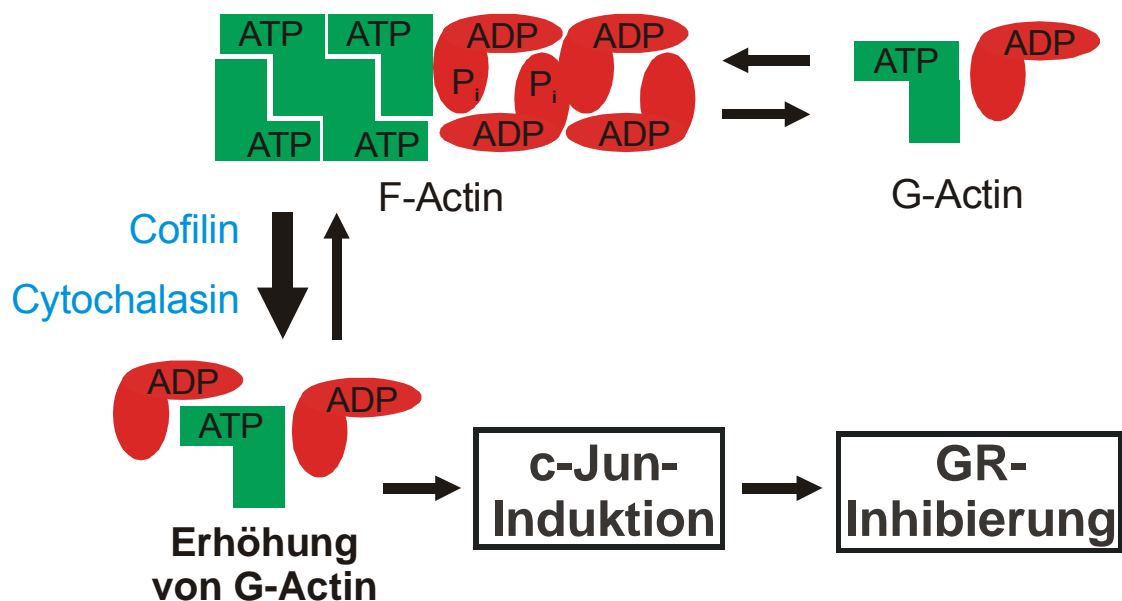


Abb. 5.2: Modell für den Wirkungsmechanismus der GR-Inhibierung durch Cofilin. Cofilin (sowie Cytochalasin) erhöht die Mengen an freiem G-Actin, was zu einer Induktion von c-Jun führt, das seinerseits den GR hemmt.

Zu diesem Modell passen auch die Befunde, dass Cofilin nicht direkt an den GR bindet, und dass die reduzierte Hormonantwort in den mutierten Zellen unabhängig

vom Promotor und dem chromosomalen Kontext ist. Dass in den mut1-Zellen keine c-Jun-Induktion zu messen war, kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in diesen Zellen nicht nur die basalen, sondern auch die stimulierten Mengen unter der Detektionsgrenze lagen. Eine andere Möglichkeit ist, dass in der mut1-Zelllinie andere unbekannte Mutationen den GR beeinflussen und/oder den Wirkungsmechanismus von Cofilin verschleiern.

Nebenbei sei hier erwähnt, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 unter anderem aus c-Jun-Homodimeren oder Heterodimeren bestehend aus c-Jun und einem anderen Transkriptionsfaktor (z.B. c-Fos) zusammengesetzt sein kann. Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung der AP-1-Transkription in der stabil Cofilin überexprimierenden Zelllinie c1, dass sie etwas erhöht ist, wenn auch nicht signifikant. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass c-Jun in diesen Zellen vermehrt vorhanden ist.

Da das Actin-Cytoskelett eine Rolle für den GR-Transport vom Cytoplasma in den Kern zu spielen scheint (Galigniana et al., 1998), wurde auch die intrazelluläre Verteilung des GR bei Überexpression von Cofilin untersucht. Der Rezeptortransport war allerdings von erhöhten Cofilinmengen nicht betroffen, hingegen veränderte sich die Rezeptorverteilung in der Abwesenheit von Hormon, so dass mehr GR im Kern zu finden ist. Interessanterweise wurde dies nicht nur bei transienter und stabiler Expression von Cofilin gefunden, sondern auch nach der Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B sowie bei Überexpression von Wildtyp-Actin und der Mutante G13R. Diese frappante Korrelation zwischen der Beeinträchtigung der Actinfilamente und der Akkumulierung von GR im Kern lässt vermuten, dass das Actin-Cytoskelett auch dazu dient, den GR im Cytoplasma zu verankern. Dies wurde bereits in einer früheren Studie vorgeschlagen wurde (Miyata and Yahara, 1991).

Eine mögliche physiologische Relevanz der inhibitorischen Wirkung von Cofilin auf den GR zeigt sich in einer aktuellen Publikation. In zwei Mausstämmen, die sich in ihrem Aggressivitätsverhalten und ihrer Stressbewältigung unterscheiden, ist Cofilin unterschiedlich reguliert (Feldker et al., 2003). Diese Stämme sind entstanden, indem über Generationen Mäuse gezüchtet wurden, die sich einem Eindringling gegenüber entweder sehr ängstlich (LAL (engl.: long attack latency) –Mäuse) oder sehr aggressiv (SAL (engl.: short attack latency)-Mäuse) verhalten (van Oortmerssen and Bakker, 1981). Die Stämme unterscheiden sich nicht nur in ihrem Verhalten, sondern auch in der Funktion ihrer HPA-Achse. LAL-Mäuse zeigen erhöhte

Glucocorticoid-Spiegel nach Stress (Veenema et al., 2003), was auf eine gestörte negative Rückkopplung und damit auf verminderte GR-Funktion zurückgeführt werden könnte. Da Cofilin in den LAL-Mäusen erhöht ist, könnte es mitverantwortlich für deren GC-Resistenz sein. Es wäre sicherlich interessant, diese Hypothese zu untersuchen, und könnte die physiologische Relevanz von Cofilin als GR-Inhibitor untermauern.

Eine ungeklärte Frage ist, welche Mutation in *mut1* verantwortlich für die Hormonresistenz ist. Durch die Sequenzierung von Cofilin konnte ausgeschlossen werden, dass die kodierende Region des Cofilin-Gens selbst mutiert wurde. Es ist möglich, dass eine Cofilin-Kinase oder -Phosphatase mutiert wurde, und sich deswegen das Verhältnis zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter Form verschoben hat. Es wurde auch nicht bewiesen, dass die Überexpression von dephosphoryliertem Cofilin in *mut1* vollständig für dessen reduzierte Hormonantwort verantwortlich ist. Durch die Analyse von *mut1*-Zellen wurde Cofilin aber als GR-Inhibitor entdeckt und damit das Ziel dieser Arbeit erreicht, durch die Herstellung und Analyse hormonresistenter Zellen einen neuen GR-regulierenden Faktor zu finden.

6. Zusammenfassung

Glucocorticoidresistenz ist ein Phänomen, das bei vielen Krankheiten eine wichtige Bedeutung hat. Insbesondere wird vermutet, dass ihr eine kausale Rolle bei depressiven Erkrankungen zukommt. In den meisten Fällen kommt die Resistenz durch eine Fehlfunktion des Glucocorticoidrezeptors zustande. Deswegen ist es von grossem Interesse, den Signalweg dieses Rezeptors im Detail zu verstehen. In der Vergangenheit wurde viel zum Verständnis beigetragen, unter anderem indem eine Reihe von GR-Regulatoren identifiziert und deren Wirkungsmechanismus aufgeklärt wurde. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Faktoren zu finden, die in die GR-Signaltransduktion verwickelt sind. Dazu wurde ein funktioneller Screen durchgeführt, der darauf beruhte, GC-resistente Zellen herzustellen, diese mit responsiven Zellen zu vergleichen und damit Kandidaten zu identifizieren, die möglicherweise die GR-Funktion regulieren. Für die Herstellung hormonresistenter Zellen wurde eine humane Zelllinie hergestellt, die in Anwesenheit von Hormon nicht überleben kann; diese wurde zufallsverteilt mutiert und in GC-haltigem Medium selektiert. Drei hormonresistente Klone konnten die Selektion überleben, einer davon wurde im Detail charakterisiert, dessen Proteinexpressionsmuster mittels 2D-Gelelektrophorese mit derjenigen der Ausgangszelllinie verglichen und die unterschiedlich exprimierten Faktoren mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Dies führte zur Identifikation von vier Kandidaten: Thioredoxin, hsp27, Reticulocalbin und Cofilin 1, deren Wirkung auf den GR in verschiedenen Zelllinien getestet wurde. Während die ersten drei keinen Einfluss auf den GR hatten, konnte Cofilin als neuer GR-Inhibitor etabliert werden. Cofilin ist gut untersucht als Depolymerisierungsfaktor des Actin-Cytoskeletts, eine Rolle im Signalweg des GRs oder eines anderen Transkriptionsfaktors war bis jetzt jedoch nicht bekannt. Es zeigte sich, dass seine inhibitorische Wirkung auf den GR von seiner Funktion in der Actin-Regulation abhängig war, und ausserdem, dass Cofilin eine Veränderung der intrazellulären Rezeptorverteilung vor Hormongabe bewirkte. In nachfolgenden Experimenten wurde gefunden, dass sowohl die chemische Zerstörung des Actin-Cytoskeletts wie auch die direkte Erhöhung des Anteils an freiem Actin zur GR-Inhibierung und veränderten Rezeptorverteilung führt. Des Weiteren wurde entdeckt, dass erhöhte Mengen an freiem Actin den bekannten GR-Inhibitor c-Jun induzieren, wodurch folgendes Modell aufgestellt wurde: Cofilin erhöht durch seine Actin-

Depolymerisierungsfunktion freies Actin, damit wird über einen noch unbekanntem Mechanismus c-Jun induziert, welches wiederum den GR inhibiert.

Damit wurde über einen zellulären genetischen Screen Cofilin 1 als ein neuer GR-Regulator identifiziert und nachfolgend der inhibierende Wirkungsmechanismus von Cofilin aufgeklärt.

7. Literaturverzeichnis

- Amsterdam, A. and Sasson, R. (2002). The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 189, 1-9.
- Bamburg, J.R. and Wiggan, O.P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends.Cell Biol.* 12, 598-605.
- Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M., and Slater, E.P. (1989). DNA regulatory elements for steroid hormones. *J.Steroid Biochem.* 32, 737-747.
- Belanoff, J.K., Kalehzan, M., Sund, B., Fleming, F.S., and Schatzberg, A.F. (2001). Cortisol activity and cognitive changes in psychotic major depression. *Am.J Psychiatry* 158, 1612-1616.
- Berg, J.M. (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57, 1065-1068.
- Borgius, L.J., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (2002). Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J Biol Chem* 277, 49761-49766.
- Carlier, M.F. (1998). Control of actin dynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10, 45-51.
- Cheng, Y.C., Huang, E.S., Lin, J.C., Mar, E.C., Pagano, J.S., Dutschman, G.E., and Grill, S.P. (1983). Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]-guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80, 2767-2770.
- Chrousos, G.P., Detera-Wadleigh, S.D., and Karl, M. (1993). Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann.Intern.Med.* 119, 1113-1124.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol.* 23, 255-275.
- Czar, M.J., Galigniana, M.D., Silverstein, A.M., and Pratt, W.B. (1997). Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry* 36, 7776-7785.
- Czar, M.J., Owens-Grillo, J.K., Dittmar, K.D., Hutchison, K.A., Zacharek, A.M., Leach, K.L., Deibel, M.R.J., and Pratt, W.B. (1994). Characterization of the protein-protein interactions determining the heat shock protein (hsp90.hsp70.hsp56) heterocomplex. *J Biol Chem* 269, 11155-11161.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2001). Glucocorticoid Repression of AP-1 Is Not Mediated by Competition for Nuclear Coactivators. *Mol.Endocrinol.* 15, 219-227.
- De Kloet, E.R. (2000). Stress in the brain. *Eur.J.Pharmacol.* 405, 187-198.

- De Kloet, E.R., Oitzl, M.S., and Joels, M. (1993). Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol.Neurobiol.* 13, 433-455.
- De Martino, M.U., Bhattachryya, N., Alesci, S., Ichijo, T., Chrousos, G.P., and Kino, T. (2004). The Glucocorticoid Receptor (GR) and the Orphan Nuclear Receptor Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II (COUP-TFII) Interact with and Mutually Affect Each Other's Transcriptional Activities: Implications for Intermediary Metabolism. *Mol.Endocrinol.* 18, 820-833.
- de Quervain, D.J., Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- DeRijk, R. and Sternberg, E.M. (1997). Corticosteroid resistance and disease. *Ann.Med.* 29, 79-82.
- Dos Remedios, C., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol.Rev.* 83, 433-473.
- Feldker, D.E., Datson, N.A., Veenema, A.H., Meulmeester, E., De Kloet, E.R., and Vreugdenhil, E. (2003). Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice. *Eur.J.Neurosci.* 17, 379-387.
- Galigniana, M.D., Scruggs, J.L., Herrington, J., Welsh, M.J., Carter-Su, C., Housley, P.R., and Pratt, W.B. (1998). Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol.Endocrinol.* 12, 1903-1913.
- Gerthoffer, W.T. and Gunst, S.J. (2001). Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl.Physiol.* 91, 963-972.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Göttlicher, ., Heck, S., Doucas, V., Wade, E., Kullmann, M., Cato, A.C., Evans, R.M., and Herrlich, P. (1996). Interaction of the Ubc9 human homologue with c-Jun and with the glucocorticoid receptor. *Steroids* 61, 257-262.
- Grove, J.R., Dieckmann, B.S., Schroer, T.A., and Ringold, G.M. (1980). Isolation of glucocorticoid-unresponsive rat hepatoma cells by fluorescence-activated cell sorting. *Cell* 21, 47-56.
- Harrison, R.W., Lippman, S.S., and VerHoeven, R. (1995). Selection of glucocorticoid-resistant mutations from an AtT-20 cell line containing a glucocorticoid-regulated selectable transgene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 209, 18-24.
- Heuser, I. and Lammers, C.H. (2003). Stress and the brain. *Neurobiol Aging* 24 *Suppl 1*, 69-76.

- Hittelman, A.B., Burakov, D., Iñiguez-Lluh, J.A., Freedman, L.P., and Garabedian, M.J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18, 5380-5388.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu.Rev.Biochem.* 54:237-71., 237-271.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F. and Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr.Rev.* 17, 187-205.
- Holsboer, F., Liebl, R., and Hofschuster, E. (1982). Repeated dexamethasone suppression test during depressive illness. Normalisation of test result compared with clinical improvement. *J Affect Disord* 4, 93-101.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L., and Stallcup, M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 4948-4952.
- Honore, B. and Vorum, H. (2000). The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* 466, 11-18.
- Hulkko, S.M., Wakui, H., and Zilliacus, J. (2000). The pro-apoptotic protein death-associated protein 3 (DAP3) interacts with the glucocorticoid receptor and affects the receptor function. *Biochem.J.* 349, 885-893.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268, 1517-1520.
- Joels, M. and De Kloet, E.R. (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog.Neurobiol.* 43, 1-36.
- Kimmins, S. and MacRae, T.H. (2000). Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress.Chaperones.* 5, 76-86.
- Kino, T. and Chrousos, G.P. (2001). EUROSTERONE MEETING Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J.Endocrinol.* 169, 437-445.
- Kiss, J.Z., van Eekelen, J.A., Reul, J.M., Westphal, H.M., and De Kloet, E.R. (1988). Glucocorticoid receptor in magnocellular neurosecretory cells. *Endocrinology* 122, 444-449.

- Klinke, R. and Silbernagl, S. (1994). Lehrbuch der Physiologie (Georg Thieme Verlag).
- Knutti, D., Kaul, A., and Kralli, A. (2000). A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol.Cell Biol.* 20, 2411-2422.
- Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 275, 15645-15651.
- Kovacs, K.J. and Sawchenko, P.E. (1996). Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci* 7, 125-133.
- Kucera, T., Waltner-Law, M., Scott, D.K., Prasad, R., and Granner, D.K. (2002). A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol Chem* 277, 26098-26102.
- Lee, H.L. and Archer, T.K. (1998). Prolonged glucocorticoid exposure dephosphorylates histone H1 and inactivates the MMTV promoter. *EMBO J.* 17, 1454-1466.
- Lee, S., Duncan, K.A., Chou, H., Chen, D., Kohli, K., Huang, C.F., and Stallcup, M.R. (1995). A somatic cell genetic method for identification of untargeted mutations in the glucocorticoid receptor that cause hormone binding deficiencies. *Mol.Endocrinol.* 9, 826-837.
- Li, X., Commane, M., Burns, C., Vithalani, K., Cao, Z., and Stark, G.R. (1999). Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol.Cell Biol.* 19, 4643-4652.
- Ma, H., Hong, H., Huang, S.M., Irvine, R.A., Webb, P., Kushner, P.J., Coetzee, G.A., and Stallcup, M.R. (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* 19, 6164-6173.
- Makino, Y., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Aoshima, M., Hirota, K., Yodoi, J., Umesono, K., Makino, I., and Tanaka, H. (1996). Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J Clin Invest* 98, 2469-2477.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., and Tanaka, H. (1999). Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J.Biol.Chem.* 274, 3182-3188.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J.Cell Biol.* 138, 771-781.
- Milhon, J., Lee, S., Kohli, K., Chen, D., Hong, H., and Stallcup, M.R. (1997). Identification of amino acids in the tau 2-region of the mouse glucocorticoid receptor that contribute to hormone binding and transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 11, 1795-1805.
- Miyata, Y. and Yahara, I. (1991). Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J.Biol.Chem.* 266, 8779-8783.
- Monder, C. (1991). Corticosteroids, receptors, and the organ-specific functions of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *FASEB J* 5, 3047-3054.
- Moon, A. and Drubin, D.G. (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol.Biol.Cell* 6, 1423-1431.
- Moriyama, K., Iida, K., and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73-86.
- Nebl, G., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (1996). Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J.Biol.Chem.* 271, 26276-26280.
- Ng, P.C. (2000). The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal.Ed.* 82, F250-F254
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Oren, A., Herschkovitz, A., Ben-Dror, I., Holdengreber, V., Ben-Shaul, Y., Seger, R., and Vardimon, L. (1999). The cytoskeletal network controls c-Jun expression and glucocorticoid receptor transcriptional activity in an antagonistic and cell-type-specific manner. *Mol.Cell Biol.* 19, 1742-1750.
- Owens, M.J. and Nemeroff, C.B. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp* 172, 296-308.
- Posern, G., Sotiropoulos, A., and Treisman, R. (2002). Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol.Biol.Cell* 13, 4167-4178.
- Pratt, W.B., Silverstein, A.M., and Galigniana, M.D. (1999). A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* 11, 839-851.
- Rabindran, S.K., Danielsen, M., Firestone, G.L., and Stallcup, M.R. (1987). Glucocorticoid-dependent maturation of viral proteins in mouse lymphoma cells: isolation of defective and hormone-independent cell variants. *Somat.Cell Mol.Genet.* 13, 131-143.

- Radoja, N., Komine, M., Jho, S.H., Blumenberg, M., and Tomic-Canic, M. (2000). Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Molecular & Cellular Biology* 20, 4328-4339.
- Reul, J.M. and De Kloet, E.R. (1986). Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem.* 24 , 269-272.
- Rooszendaal, B. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25, 213-238.
- Rooszendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn.Mem.* 78, 578-595.
- Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276, 36865-36868.
- Sarrieau, A., Vial, M., Philibert, D., and Rostene, W. (1984). In vitro autoradiographic localization of [3H]corticosterone binding sites in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 98, 151-152.
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., and Smith, D.F. (2001). Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen.Comp.Endocrinol.* 124, 152-165.
- Schaaf, M.J. and Cidlowski, J.A. (2003a). Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol.Cell Biol.* 23, 1922-1934.
- Schaaf, M.J. and Cidlowski, J.A. (2003b). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 83, 37-48.
- Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62 , 1217-1226.
- Shibuya, T. and Morimoto, K. (1993). A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat.Res.* 297, 3-38.
- Sitcheran, R., Emter, R., Kralli, A., and Yamamoto, K.R. (2000). A genetic analysis of glucocorticoid receptor signaling. Identification and characterization of ligand-effect modulators in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 963-972.
- Smith, D.F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol.Endocrinol.* 7, 1418-1429.
- Taft, S.A., Liber, H.L., and Skopek, T.R. (1994). Mutational spectrum of ICR-191 at the hprt locus in human lymphoblastoid cells. *Environ.Mol.Mutagen.* 23, 96-100.

- Trapp, T. and Holsboer, F. (1996). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci* 17, 145-149.
- Trapp, T., Rupprecht, R., Castren, M., Reul, J.M., and Holsboer, F. (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13, 1457-1462.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R.J., and Beato, M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14, 1737-1751.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* 63:451-86., 451-486.
- van Oortmerssen, G.A. and Bakker, T.C. (1981). Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav.Genet.* 11, 115-126.
- Veenema, A.H., Meijer, O.C., De Kloet, E.R., Koolhaas, J.M., and Bohus, B.G. (2003). Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Horm.Behav.* 43, 197-204.
- Wagner, E. and Lykke-Andersen, J. (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci.* 115, 3033-3038.
- Wakui, H., Wright, A.P., Gustafsson, J., and Zilliacus, J. (1997). Interaction of the ligand-activated glucocorticoid receptor with the 14-3-3 eta protein. *J.Biol.Chem.* 272, 8153-8156.
- Wallace, A.D. and Cidlowski, J.A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J.Biol.Chem.* 276, 42714-42721.
- Wallberg, A.E., Neely, K.E., Hassan, A.H., Gustafsson, J.A., Workman, J.L., and Wright, A.P. (2000). Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain [In Process Citation]. *Mol Cell Biol* 20, 2004-2013.
- Webster, M.J., Knable, M.B., O'Grady, J., Orthmann, J., and Weickert, C.S. (2002). Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol.Psychiatry* 7, 985-94, 924.
- Wieske, M., Benndorf, R., Behlke, J., Dolling, R., Grelle, G., Bielka, H., and Lutsch, G. (2001). Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin inhibit actin polymerization. *Eur J Biochem.* 268, 2083-2090.
- Windahl, S.H., Treuter, E., Ford, J., Zilliacus, J., Gustafsson, J.A., and McEwan, I.J. (1999). The nuclear-receptor interacting protein (RIP) 140 binds to the human glucocorticoid receptor and modulates hormone-dependent transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71, 93-102.

- Yabe, D., Nakamura, T., Kanazawa, N., Tashiro, K., and Honjo, T. (1997). Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem* 272, 18232-18239.
- Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K., and Natori, S. (1982). Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro. *J Cell Biol* 92, 69-78.
- Yang, L., Guerrero, J., Hong, H., DeFranco, D.B., and Stallcup, M.R. (2000). Interaction of the tau2 transcriptional activation domain of glucocorticoid receptor with a novel steroid receptor coactivator, hic-5, which localizes to both focal adhesions and the nuclear matrix. *Mol.Biol.Cell.* 11, 2007-2018.
- Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11, 3681-3694.
- Zobel, A.W., Yassouridis, A., Frieboes, R.M., and Holsboer, F. (1999). Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *Am.J.Psychiatry* 156, 949-951.

8. Abkürzungen

2(3)D	2(3)-dimensional
ACTH	adrenocorticotropines Hormon
AF	Aktivierungsfunktion
AP-1	Aktivator Protein 1
CR	Corticosteroidrezeptor
CRH	engl.: corticotropin-releasing hormone
Cyp	Cyclophilin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dex	Dexamethason
E.coli	Escherichia coli
(E)GFP	engl.: (enhanced) green fluorescence protein
ENU	engl.: ethylnitrosourea
ER	engl.: Estrogen receptor
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
F-Actin	filamentöses Actin
FKBP	FK506-bindendes Protein
G-Actin	freies Actin
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoidrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAT	Histone-Acetyltransferase
Hsp	Hsp-organisierendes Protein
HPA	engl.: hypothalamic-pituitary-adrenal
Hsp	engl.: heat shock protein
IEF	isoelektrische Fokussierung
LAL	engl.: long attack latency
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
Min	Minute
MMTV	engl.: mouse mammary tumour virus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie

Abkürzungen

MT	Metallothionein
NF κ B	engl: nuclear factor kappa B
(n)GRE	(negatives) Glucocorticoid-responsives Element
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NR	nukleärer Rezeptor
OD	optische Dichte
PAGE	engl.: polyacrylamide gel electrophoresis
POMC	Proopiomelanocortin
PR	Progesteronrezeptor
puro ^R	Puromycinresistenz
PVN	Nucleus paraventricularis
RAR	engl: retinoic acid receptor
RXR	engl: retinoic X receptor
s	Sekunde
SAL	engl.: short attack latency
SEM	
SRF	engl.: serum response factor
TK	Thymidinkinase
TR	Thyroidhormonrezeptor
wt	wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Joëlle Béatrice Rüegg

Geburtsdatum 5.12.1975
Geburtsort Zürich (Schweiz)
Nationalitäten Schweizerisch, Deutsch
Familienstand ledig

Bildungsweg

1982-1988 Primarschule in Zürich
1988-1994 Klassisches Gymnasium in Zürich, Abitur im September 1994
1994-1999 Studium in Biochemie und Psychologie an der Universität Zürich, Diplom im Juni 1999
1999-2000 Masters-Studiengang in Neurowissenschaften an der University of Edinburgh, Masters degree im September 2000
11.2000-12.2004 Promotionsstudium am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München, Doktorat „summa cum laude“ am 1.12.2004